

Aus dem Institut für Biochemie  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

**DISSERTATION**

**Struktur und Funktion des Gens für das  
translationell kontrollierte Tumorprotein  
(TCTP)**

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Holger Thiele  
aus Hennigsdorf

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Felix

Gutachter:

1. Prof. Dr. H. Kühn
2. PD Dr. P. Nürnberg
3. Dr. U. Bommer

Datum der Einreichung: Juni 1999

Datum der Promotion: 28. Februar 2000

“Wir wissen nicht, wo oder wie wir mit der Analyse dieser Welt beginnen sollen. Es gibt keine höhere Weisheit, die es uns sagt. Selbst die wissenschaftliche Weisheit sagt es uns nicht. Sie sagt uns nur, wo und wie andere Menschen angefangen haben und wie weit sie gekommen sind.”

SJR KARL POPPER

“Erfahrung ist eine herrliche Sache. Mit ihrer Hilfe erkennen wir einen Fehler jedesmal wieder, wenn wir ihn erneut begehen.”

FRANKLIN P. JONES

“Gewöhnlich sind schreckliche Dinge, die mit der Entschuldigung getan werden, daß der Fortschritt sie verlange, nicht wirklich Fortschritte, sondern nur schreckliche Dinge.

RUSSEL BAKER

# Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i> .....	<i>I</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....	<i>III</i>
<b>1 AUFGABENSTELLUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
2.1 DIE FUNKTION DES TRANSLATIONELL KONTROLLIERTEN TUMORPROTEINS (TCTP).....	3
2.1.1 TCTP - das wachstums- und translationell regulierte Protein.....	3
2.1.2 TCTP - das Strukturprotein .....	8
2.1.3 TCTP - der Histamin-Releasing-Factor (HRF).....	8
2.2 DIE VERSCHIEDENEN EBENEN DER EXPRESSIONSKONTROLLE .....	12
2.3 DIE REGULATION DER TRANSKRIPTION .....	13
2.3.1 Der Aufbau eukaryontischer Gene .....	13
2.3.2 Prinzipien der Transkriptionsregulation .....	14
2.3.3 Allgemeine Transkriptionsfaktoren .....	15
2.3.4 Spezielle Transkriptionsfaktoren .....	16
2.4 DIE ENTSTEHUNG VON PSEUDOGENEN .....	18
2.4.1 Die Organisation und Evolution des Kern-Genoms .....	18
2.4.2 Prozessierte Pseudogene .....	21
2.4.3 Nicht prozessierte Pseudogene.....	24
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>25</b>
3.1 MATERIALIEN .....	25
3.1.1 Geräte .....	25
3.1.2 Chemikalien.....	25
3.1.3 Radiochemikalien.....	26
3.1.4 Synthetische Oligonukleotide.....	26
3.1.5 Enzyme, Kits und sonstiges .....	27
3.1.6 Soft- und Hardware .....	28
3.2 METHODEN .....	28
3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
3.2.2 Radioaktiv markierte Sonden.....	28
3.2.3 Southernblots .....	29
3.2.4 Hybridisierungen mit DNA und RNA Sonden .....	29
3.2.5 Sequenzierungen .....	30
3.2.6 Screening einer genomischen Lambda DASH® Phagenbank .....	30
3.2.7 Screening einer P1-Bank nach genomischen Human-TPT1-Klonen.....	30
3.2.8 Subklonierung genomischer Fragmente .....	31
3.2.9 CAT-Assays.....	32
3.2.10 Dotblots .....	33

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
4.1	DIE STRUKTUREN DER TCTP-MRNAs	34
4.1.1	<i>TCTP-mRNA-Varianten mit alternativen 3'UTRs</i>	34
4.1.2	<i>Unterschiede in der gewebsspezifischen Transkription der TCTP-mRNAs bei Mensch und Kaninchen</i>	37
4.2	AUFKLÄRUNG DER STRUKTUR DES <i>TPT1</i> -GENS DES KANINCHENS	44
4.2.1	<i>Genomische Southernblots</i>	44
4.2.2	<i>Screening einer Lambda DASHII Phagenbank</i>	45
4.2.3	<i>Subklonierung und Kartierung des <i>TPT1</i>-Gens</i>	46
4.2.4	<i>Vollständige Sequenzierung des Gens und Aufklärung der Intron-Exon Übergänge</i>	47
4.2.5	<i>Genomische Southernblots mit intron- und exonkodierenden Sonden</i>	51
4.3	FUNKTIONELLE ANALYSE DER PROMOTORREGION DES <i>TPT1</i> -GENS DES KANINCHENS	53
4.3.1	<i>Klonierung von CAT-Reportergenkonstrukten aus Teilen des Promotors</i>	53
4.3.2	<i>Transfektion von glatten Kaninchenmuskelzellen (SMC) mit <i>TPT1</i>-Promotorgenkonstrukten</i>	55
4.3.3	<i>Transfektion einer humanen Zelllinie mit dem CAT-Konstrukt -918/+80</i>	57
4.3.4	<i>Analyse der CpG-Inseln des <i>TPT1</i>-Gens</i>	58
4.3.5	<i>Mögliche TF-Bindungsstellen im <i>TPT1</i>-Promotor des Kaninchens</i>	59
4.4	AUFKLÄRUNG DER STRUKTUR DES HUMANEN <i>TPT1</i> -GENS	59
4.5	ANALYSE VON 13 <i>TPT1</i> -PSEUDOGENKLONEN	61
4.5.1	<i>Subklonierung von genomischen Fragmenten</i>	61
4.5.2	<i>Sequenzierung und Analyse der Pseudogene</i>	62
4.5.3	<i>Untersuchung der flankierenden Bereiche der Pseudogene</i>	65
4.5.4	<i>Promotoraktivität der 5'-flankierenden Regionen der Pseudogene</i>	65
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>68</b>
5.1	EIN VERGLEICH DER <i>TPT1</i> -GENE VON MENSCH UND KANINCHEN	68
5.2	DIE TRANSKRIPTIONSREGULATION DES <i>TPT1</i> -GENS	70
5.2.1	<i>Auswertung der CAT-Assays und Analyse der Promotorsequenzen</i>	70
5.2.2	<i>Vergleich der <i>TPT1</i>-Promotoren von Mensch und Kaninchen</i>	73
5.2.3	<i><i>TPT1</i>-Induktoren</i>	74
5.2.4	<i>Beschreibung der potentiell bindenden TF</i>	77
5.3	DIE STRUKTUREN DER TCTP-MRNAs	86
5.4	(UN)SINN DER PSEUDOGENE	90
5.5	AUSBlicKE	93
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>96</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>		<b>100</b>
<i>Danksagung</i>		<i>109</i>
<i>Erklärung</i>		<i>110</i>
<i>Lebenslauf</i>		<i>111</i>
<i>Publikationsliste</i>		<i>112</i>

# Abkürzungsverzeichnis

Ak ..... Antikörper  
 AP-1 ..... Aktivatorprotein 1  
 ATF-1 ..... Aktivierender  
                   Transkriptionsfaktor 1  
 bp ..... Basenpaar(e)  
 cAMP ..... zyklisches  
                   Adenosinmonophosphat  
 CBP ..... CREB bindendes Protein  
 CRE ..... cAMP responsables Element  
 CREB ..... cAMP responsables Element  
                   bindendes Protein  
 CREB-P1 ..... CRE bindendes Protein 1  
 CAT ..... Chloramphenicoltransferase  
 DIG ..... Diacylglycerol  
 DMSO ..... Dimethylsulfoxid  
 DNA ..... Desoxyribonukleinsäure  
 ERK ..... extrazellulär regulierte Kinase(n)  
 FKS ..... fötales Kälberserum  
 HIV ..... „human immunodeficiency  
                   virus“  
 hnRNPs ..... heterogene nukleäre  
                   Ribonukleoproteine  
 HRF ..... Histamin-Freisetzungsfaktor  
 HSV ..... Herpes simplex Virus  
 Ig ..... Immunglobulin  
 IL ..... Interleukin  
 IP<sub>3</sub> ..... Inositol 1,4,5-triphosphat  
 JAK ..... Janus-Kinase  
 JNK ..... Jun-Kinase  
 kb ..... Kilobase(n)  
 kd ..... Kilodalton  
 LINE ..... „long interspersed nuclear  
                   elements“  
 LOX ..... Lipoxygenase  
 LTR ..... „long terminal repeat“  
 LPS ..... Lipopolysaccharide  
 MAP ..... Mikrotubuli-assoziiertes Protein  
 MAP-Kinase ..... mitogen aktivierte Proteinkinasen  
 Mb ..... Megabasen

MCS ..... “multi cloning site”  
                   Multiklonierort  
 MZF-1 ..... myeloides Zinkfingerprotein 1  
 mRNA ..... messenger Ribonukleinsäure  
 mRNP ..... messenger Ribonukleoprotein  
 NF-1 ..... Nukleärer Faktor 1  
 nt ..... Nukleotide  
 ORF ..... “open reading frame” - offener  
                   Leserahmen  
 pfu ..... “plaque forming unit”  
 PIP<sub>2</sub> ..... Phosphatidylinositol 4,5-  
                   bisphosphat  
 PKA ..... Proteinkinase A  
 PKC ..... Proteinkinase C  
 polyA ..... Poly-Adenylsäure  
 RNA ..... Ribonukleinsäure  
 RNP ..... Ribonukleoprotein  
 SAPK ..... Stress aktivierte Proteinkinase  
 SINE ..... „short interspersed nuclear  
                   elements“  
 SP-1 ..... Stimulierendes Protein 1  
 SRE ..... Serum responsables Element  
 STAT-1 ..... “signal transducers and activator  
                   of transcription”  
 TAF ..... TBF assoziierter Faktor  
 TBF ..... TATA-Box bindender Faktor  
 TCTP ..... translationell kontrolliertes  
                   Tumorprotein  
 TF ..... Transkriptionsfaktor(en)  
 TNF $\alpha$  ..... Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$   
 TPA ..... Tetradecanoylphorbolacetat  
                   (Phorbol ester, PMA)  
 TRE ..... TPA responsables Element  
 UTR(s) ..... untranslatierte Region(en)  
 ZNS ..... zentrales Nervensystem  
 ZSD ..... Zielsequenzduplikation(en)

# 1 Aufgabenstellung

Das translationell kontrollierte Tumorprotein (TCTP) ist ein ubiquitär in Eukaryonten vorkommendes Protein mit einem Molekulargewicht von 19,4 kd (Mensch, Kaninchen). Sein Gen trägt die Bezeichnung *TPT1*. Trotz seiner bislang unklaren Funktion, die wegen seiner Fähigkeit zur effektiven Tubulin-Bindung im Bereich des Zytoskeletts vermutet wird, ist dieses Protein aus mehreren Gründen für das Forschungsgebiet der molekularen Medizin interessant.

Physiologische Zellfunktionen sind durch die regulierte Expression genetischer Information charakterisiert. Deren Expression wird sowohl auf der Ebene der DNA (Transkription) als auch der mRNA (Translation) kontrolliert. Störungen dieser Regelkreise können zu Tod und Entartung von Zellen führen und sind die Ursache einer Vielzahl von Erkrankungen.

Es konnte gezeigt werden, daß TCTP bei atopischen Kindern mit Nahrungsmittel-unverträglichkeiten und allergischen Hautekzemen als Histamin-Freisetzungsfaktor (HRF) fungieren kann. Diese Histamin- und auch IL-4-Freisetzung aus basophilen Granulozyten war IgE-abhängig. Dies lieferte den Hinweis dafür, daß TCTP in die Pathomechanismen involviert sein könnte, die für die Entstehung allergischer atopischer Erkrankungen verantwortlich sind. TCTP "knock out" Experimente mit Hefen zeigten, daß die Ausschaltung des *TPT1*-Gens nicht zu den letalen Mutationen gehört, aber für das Zellwachstum von Bedeutung ist. Dafür sprechen auch Daten, die eine starke Abhängigkeit seiner Zytoskelett-Assoziation vom Zellzyklus zeigen. Damit ist es sehr wahrscheinlich, daß es mit TCTP-Mutationen verknüpfte Erkrankungen gibt, die aber noch nicht auf ihre Ursache zurückgeführt werden können. Die Tatsache, daß TCTP in allen Eukaryonten vorkommt und hochgradig konserviert blieb, unterstreicht die Bedeutung des Proteins.

Die Ebenen der Expression des *TPT1*-Gens sind bisher erst in Anfängen untersucht. Die Entdeckung des TCTP ist mit der Tatsache verknüpft, daß die mRNA im Zytosol als translationsinaktiver mRNP-Komplex gefunden wurde, was auf eine spezifische Translationskontrolle hinwies. Die TCTP-mRNA gehört zu den sogenannten "Poly-Pyrimidintrakt-mRNAs", die am 5'-Ende der 5'-untranslatierten Region eine typische pyrimidinreiche Sequenz aufweisen. Dieses Motiv ist wahrscheinlich in die mRNA-spezifische Kontrolle der Translation involviert. Es gibt auch Hinweise auf die Bedeutung der

3'-untranslatierten Region der mRNA für die Translationskontrolle. Die Mechanismen dieser Regelvorgänge sind bisher jedoch unbekannt und Gegenstand eines anderen Projekts unserer Arbeitsgruppe.

Meine Aufgabe sollte darin bestehen, die transkriptionelle Ebene der Expression des *TPT1*-Gens zu untersuchen. Frühe Arbeiten haben gezeigt, daß TCTP durch Dimethylsulfoxid induziert werden kann. Von dieser Substanz weiß man, daß sie auch auf transkriptioneller Ebene wirkt. Später wurden weitere Induktoren wie Phorbol ester, Lipopolysaccharide, IL-3 und Schwermetalle bekannt. Auch sie werden überwiegend mit Genaktivierungen in Verbindung gebracht. Die Wirkung dieser Induktoren unterscheidet sich in den verschiedenen Geweben. Dies weist auf die Mitwirkung gewebsspezifischer Faktoren hin. Die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen setzt Kenntnisse über die Struktur des Gens und die Funktion des Promotors voraus. Von keiner Spezies waren jedoch bislang die Gene bekannt, oder Einsichten in die Strukturen der Gen-Kontrollregionen beschrieben worden.

Primäres Ziel der Arbeit war die erstmalige Aufklärung der Natur eines Säuger-*TPT1*-Gens, sowie Zelltransfektions-Studien zur Funktion des Promotors. Dies schloß weiterhin Untersuchungen zur Natur der gebildeten Transkripte und einer möglichen Gewebsspezifität ihrer Expression ein. Weiterhin sollte Hinweisen auf die Existenz alternativer verwandter Gene oder Pseudogene nachgegangen werden. Die spätere Identifizierung von zahlreichen *TPT1*-Pseudogenen führte zur Beschäftigung mit der Frage, wie Pseudogene und andere Vertreter retroviralen Elemente entstehen.

Die Hauptarbeiten zur Struktur und Funktion des *TPT1*-Gens wurden beim Kaninchen durchgeführt, Teilaspekte jedoch auch am menschlichen *TPT1*-Gen. Die gleichzeitige Untersuchung beider Spezies bot einige Vorteile. So können einige Experimente nur am Tiermodell durchgeführt werden. Vom Menschen dagegen existieren zahlreiche Zelllinien und Untersuchungsmöglichkeiten, die keine Entsprechung zum Tiermodell haben. Der Vergleich konservierter Elemente, besonders im Promotorbereich, ließ Einsichten in bestimmte funktionelle Fragestellungen erwarten. Darüber hinaus waren Erkenntnisse zur Regulation der humanen TCTP Synthese aus medizinisch-pathogenetischer Sicht von großer Bedeutung, da bislang atopische Erkrankungen im Zusammenhang mit dem TCTP nur beim Menschen beschrieben worden sind.



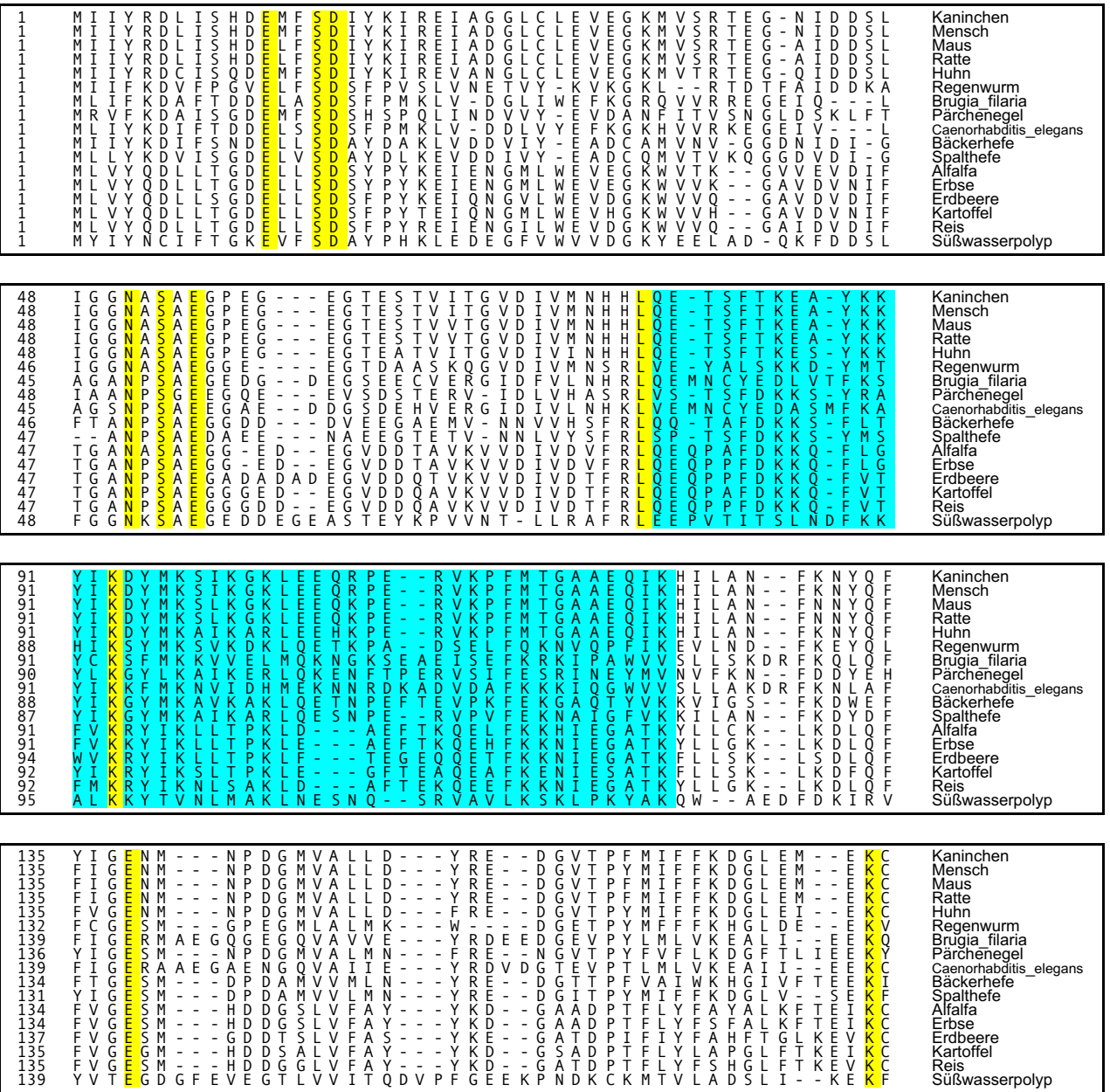
## 2 Einleitung

### 2.1 Die Funktion des translationell kontrollierten Tumorproteins (TCTP)

#### 2.1.1 TCTP - das wachstums- und translationell regulierte Protein

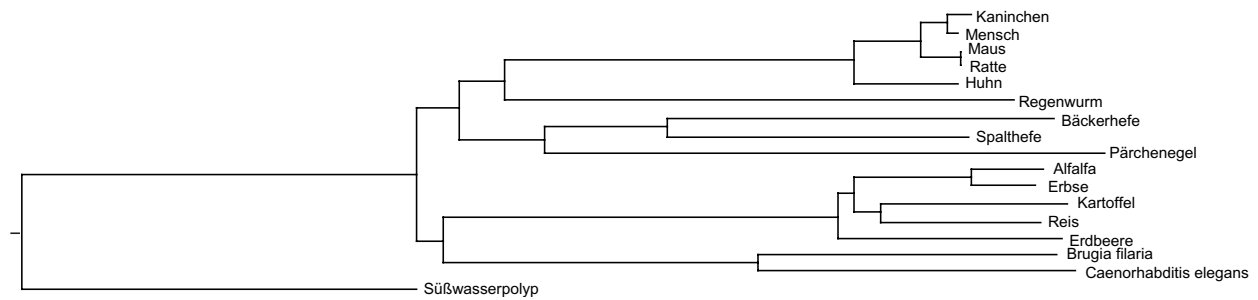
Stimuliert man eukaryontische Zellkulturen zum Wachstum, so kann man einen Wechsel der exprimierten Proteinmuster beobachten. Verschiedene Arbeitsgruppen widmeten sich dieser Thematik unter der Fragestellung der Identifizierung wachstumsregulierter Proteine und der Ebene ihrer Regulation. Frühe Arbeiten dieser Art konnten einen signifikanten Wechsel von etwa 20 verschiedenen Proteinen in Swiss mouse 3T3 Zellen zeigen, von denen etwa die Hälfte auf der translationellen Ebene kontrolliert wurde. Eines dieser translationell kontrollierten Proteine wurde als **Q23** bezeichnet (**Thomas et al. 1981, Thomas und Thomas 1986**). Andere Arbeitsgruppen fanden das gleiche Protein als **p21** in Maus-Erythroleukämiezellen (**Yenofsky et al. 1983, Chitpatima et al. 1988**) und in Ehrlich aszites Tumorzellen mit der Bezeichnung **p23** (**Benndorf et al. 1988, Böhm et al. 1989, Böhm et al. 1991**). Die unterschiedlichen Namen gehen auf das geschätzte Molekulargewicht in Elektrophoreseläufen zurück. Das exakte Molekulargewicht des klonierten Säugerproteins (Mensch und Kaninchen) beträgt 19,4 kd.

Die heutige Bezeichnung **TCTP** ist als Abkürzung für “translationally controlled tumor protein” zu verstehen und soll zum Ausdruck bringen, daß das Protein in Tumorzellen vorkommt und daß seine Synthese auf der Ebene der Translation kontrolliert wird. Mehrere Veröffentlichungen, unter anderem auch Ergebnisse dieser Arbeit, zeigen indessen, daß es sich keineswegs um ein tumorspezifisches Protein handelt, sondern daß es in zahlreichen Geweben und Spezies exprimiert wird und als ubiquitär vorkommendes, konserviertes Protein betrachtet werden muß. Dies geht auch aus dem Vergleich der Proteinsequenzen verschiedener Spezies hervor (Abb. 2-1). In diesem Kontext ist der Name TCTP etwas irreführend. Da er jedoch überwiegend in Publikationen und Datenbanken benutzt wird, sollte er bis zur endgültigen Aufklärung seiner Funktion beibehalten werden. Der Name des Gens wird heute nach der GDB (genome database) Nomenklatur (Zugangsnummer GDB:1060912) als *TPT1* bezeichnet (**Cayanis et al. 1998**). Entsprechend werden in dieser Arbeit das Protein und die mRNA TCTP genannt, das Gen und die Pseudogene *TPT1*.



**Abb. 2-1 Interspezies-Sequenzalignment bisher veröffentlichter TCTP-Proteinsequenzen (Stand 8/98):** Von den aufgelisteten 17 Proteinsequenzen sind Vertreter der Primaten, Nager, Vögel, einzelliger Eukaryonten, Nematoden, Protozoen und Pflanzen dargestellt. Konservierte Aminosäuren wurden gelb hervorgehoben. Der blau markierte Abschnitt stellt den für die Bindung des TCTP an Tubulin (Kap. 2.1.2) verantwortlichen Bereich dar.

Ein näherer Blick auf nah verwandte Spezies offenbart hohe Homologiegrade. Zwischen der Maus- und Rattensequenz beträgt die Übereinstimmung z.B. 100%, zwischen Kaninchen und Mensch 98%. Auch zwischen den verschiedenen Pflanzenarten ist die Homologie ausgeprägt (zwischen 73% und 93% in den verglichenen Pflanzenarten). Einen besseren Überblick über phylogenetische Zusammenhänge liefert Abb. 2-2.



**Abb. 2-2: Abstammungsbaum des TCTP in verschiedenen Spezies.** Vertebraten und Pflanzen fallen durch ihre hohen Homologien untereinander als Gruppen auf. Größere Abweichungen sind erwartungsgemäß beim Regenwurm, Schistosomen, Filarien und der Hefe sichtbar. Sie repräsentieren evolutionär weiter entfernt liegende Spezies.

Beim Vergleich der Proteinsequenzen zeigen sich eine Reihe von gruppenspezifischen Mutationen, etwa die Aminosäuren 42-50, 62-69 und 118-122 als pflanzentypische Domänen. Andere Positionen sind in allen Spezies identisch (Aminosäuren: 12, 15, 16, 51, 53, 55, 78, 93, 138 und 171). Von diesen Aminosäuren kann man erwarten, daß sie unter evolutionärem Erhaltungsdruck standen und wahrscheinlich an den physiologischen Funktionen des Proteins direkt beteiligt sind. Interessanterweise sind zwei der 10 konservierten Aminosäuren Serine. Diese Aminosäure ist wie Threonin und Tyrosin Angriffspunkt spezifischer Proteinkinasen. In der Literatur wurden Isoformen des TCTP beschrieben (**Sanchez et al. 1997a**). Ihre Entstehung ließe sich plausibel mit einer Phosphorylierung erklären.

Die Tatsache, daß TCTP auch als Histaminfreisetzungsfaktor beim Menschen bekannt wurde (**MacDonald et al. 1995, Schroeder et al. 1996**), paßt im Hinblick auf die vermutete physiologische Funktion des Proteins nur schlecht in das Bild eines ubiquitär verbreiteten Proteins. Als Bestandteil des Pathomechanismus für Krankheiten aus dem allergischen Formenkreis gewinnt das TCTP jedoch an erheblicher Bedeutung (siehe Kapitel 2.1.3).

Die ersten Veröffentlichungen über die Wachstumsabhängigkeit des TCTP zeigten, daß sich das Protein in Abhängigkeit vom Alter des Ehrlich aszites Tumors anreicherte (**Benndorf et al. 1988**). Viele Tumoren, wie auch der Ehrlich aszites Tumor, zeigen charakteristische Wachstumskurven. Nach einer Phase exponentiellen Wachstums verlangsamt sich die Zellteilung und Tumorexpansion - wahrscheinlich durch autokrine inhibitorische Impulse (**Andersson 1977, Denhardt et al. 1986**). TCTP gehörte hierbei zu den Proteinen, die sich bevorzugt in der frühen Phase des Tumorwachstums nachweisen ließen. Zusätzlich ließ sich die

TCTP-Synthese durch Serum stimulieren (**Benndorf et al. 1988**). Diese Experimente ließen vermuten, daß TCTP zellzyklusabhängig exprimiert wird. Neue Daten zeigen darüberhinaus eine starke Abhängigkeit der Bindung des TCTP an das Zytoskelett vom Zellzyklus (**Gachet et al. 1999**).

Die postulierte posttranskriptionelle Regulation des TCTP stützte sich auf folgende Experimente:

1. Die Tatsache, daß sich die Expression des TCTP durch Serum in sehr kurzer Zeit (10 Minuten) stimulieren ließ. Da die Neusynthese von mRNA eine gewisse Zeit benötigt, mußte von einer Aktivierung schon vorhandener mRNA ausgegangen werden.
2. Inhibitoren der Transkription wie  $\alpha$ -Amanitin und Aktinomycin D hatten keinen reduzierenden Effekt auf die Expression. Aktinomycin D erwies sich sogar als sehr effektiver Stimulator der Expression.
3. Dem zellzyklusabhängigen Wechsel im Proteinniveau stand eine konstante Menge an TCTP-mRNA in den verschiedenen Tumorstadien gegenüber (**Böhm et al. 1989**).
4. Die Gruppe von G. Brawerman hatte schon einige Zeit vorher herausgefunden, daß die mRNA von p21 als inaktiver mRNP-Komplex zytosolisch akkumuliert wird, und daß sich die Bildung der mRNP-Partikel durch DMSO induzieren ließen - wahrscheinlich als Folge einer *TPT1*-Genaktivierung (**Yenofsky et al. 1983**).

In dem Bestreben die Translationskontrolle des TCTP weiter aufzuklären, wurde der Einfluß der untranslatierten mRNA-Regionen auf den Translationsarrest untersucht. Die Experimente identifizierten eindeutig die UTRs der mRNA als Vermittler der Translationsinaktivierung. Deletionsmutanten der 5'UTR als auch der 3'UTR erwiesen sich in Tumorzelllysaten als effizienter translatierbar als die kompletten mRNAs einschließlich ihrer UTRs. Die größte Inhibition ging von der 5'UTR aus. Diese Effekte scheinen jedoch auf tierische Zellen beschränkt zu sein. Zellfreie Translationssysteme aus Weizenkeimlysaten translatierten dagegen auch den unmanipulierten TCTP-Messenger (**Böhm et al. 1991**). Dies spricht dafür, daß für die Vermittlung der Translationskontrolle zellspezifische Faktoren nötig sind, die in pflanzlichen Zellen fehlen oder nicht kompatibel sind.

Bommer et al. konnten die Beteiligung des Elongationsfaktors eIF-4E an der Regulation der Translation zeigen (**Bommer et al. 1994**). Nach diesen Befunden ist die Translatierbarkeit der TCTP-mRNA vom Faktor eIF-4E und der starken räumlichen Faltung der TCTP-mRNA abhängig (**Russel und Clemens unpubliziert**). Vorstellbar wäre demnach, daß der Faktor eIF-4E als Teil der mRNA-Aufwindungsmaschinerie seine Funktion durch Überwindung der 5'UTR-seitigen Sekundärstrukturen ausübt.

Eine Reihe von zusätzlichen Erkenntnissen steuerten Arbeitsgruppen bei, die sich dem Thema TCTP von sehr unterschiedlichen Richtungen näherten. So fand man TCTP in verschiedenen Spezies darunter *Caenorhabditis elegans* (**Bini et al. 1997**), *Trypanosoma brucei* (**Nasser et al. 1992**), oder den Pflanzen *Alfalfa* (**Pay et al. 1992**) und *Pharbitis* (**Sage-Ono et al. 1998**). Man entdeckte TCTP in vielen humanen Geweben darunter Hepatozyten, Makrophagen, Erythrozyten, Thrombozyten, Keratinozyten, Melanomzellen, Hepatoblastomzellen, Erytroleukämiezellen, Lymphomzellen und Gliomzellen. Lediglich in Nierenzellen und Nierenkarzinomzellen war es nicht detektierbar (**Hughes et al. 1993, Walsh et al. 1995, Sanchez et al. 1997a**).

Man fand heraus, daß TCTP zu den kalziumbindenden Proteinen zählt (**Nasser et al. 1992, Sanchez et al. 1997a**), und daß sich TCTP in Makrophagen durch Phorbolster und Lipopolysaccharide induzieren läßt (**Walsh et al. 1995**). Andere Induktoren der TCTP-Expression, wie die Schwermetalle Cadmium und Kupfer, wurden bei Regenwürmern gefunden, die schwermetallbelasteten Böden ausgesetzt waren (**Sturzenbaum et al. 1998**). Auch IL-3 brachte man in Verbindung mit der Expressionsstimulation des TCTP (**Nielsen et al. 1998**). Es konnte gezeigt werden, daß in der Pflanze *Pharbitis* eine hell/dunkel-abhängige Induktion von TCTP-mRNA als Hinweis auf eine spezifisch pflanzliche Transkriptionsregulation auftritt (**Sage-Ono et al. 1998**).

Weiterhin existieren Befunde, daß TCTP in den Wirkmechanismus des Antimalariamittels Artesiminin eingreift (**Bhisutthibhan et al. 1998**). Ob sich hieraus neue Thearapiekonzepte in der Bekämpfung des Erregers der Malaria tropica, *Plasmodium falciparum* ergeben, bleibt abzuwarten.

### **2.1.2 TCTP - das Strukturprotein**

Trotz der bis heute ungeklärten physiologischen Funktion des Proteins gibt es neue Daten für eine Beteiligung des TCTP an Strukturen des Zytoskeletts. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß TCTP mit  $\alpha$ -Tubulin und  $\beta$ -Tubulin kolokalisiert ist und in vitro an Tubulin bindet (**Gachet et al. 1999**). In der Zelle liegt das Protein in Komplexen von 100-140 kd vor. In dieser Form läßt es sich mit Anti-Tubulin-Ak immunopräzipitieren. Die Bindung des TCTP an Tubulin ließ sich in der S<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> und frühen M-Phase des Zellzyklus nachweisen. Während der Metaphase bis zur Anaphase fanden die Autoren außerdem eine zeitlich limitierte Assoziation mit der Mitosespindel. Die Tubulinbindungsdomäne konnte durch Mutationsanalysen bestimmt werden. Sie hat Ähnlichkeiten mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein MAP-1B (Abb. 2-1). Weitere Hinweise auf die Funktion des TCTP lieferten Experimente, in denen das Protein überexprimiert wurde. Derartige Zellen waren wachstumsgestört, morphologisch verändert und zeigten eine erhöhte Tubulinstabilität.

Zusammengenommen deutet sich an, daß TCTP als ein neues Mitglied der MAPs einzuordnen ist. Tubulin ist neben Actin und Intermediärfilamenten ein Träger des Zytoskeletts der Zelle. Tubulin polymerisiert dabei zu langen Röhren (Mikrotubuli). Entsprechend der vielfältigen Funktionen dieses Strukturproteins existieren dementsprechend eine große Anzahl von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen.

Die Tatsache, daß TCTP in der Meta/Anaphase zeitlich begrenzt mit der Mitosespindel wechselwirkt, liefert einen Hinweis auf spezifische Aktivierungsmechanismen. Da TCTP zu den kalziumbindenden Proteinen gehört, und mehrere Isoformen des Proteins existieren (**Sanchez et al. 1997a**), stehen mehrere Modifizierungsmöglichkeiten erklärend zur Diskussion.

### **2.1.3 TCTP - der Histamin-Releasing-Factor (HRF)**

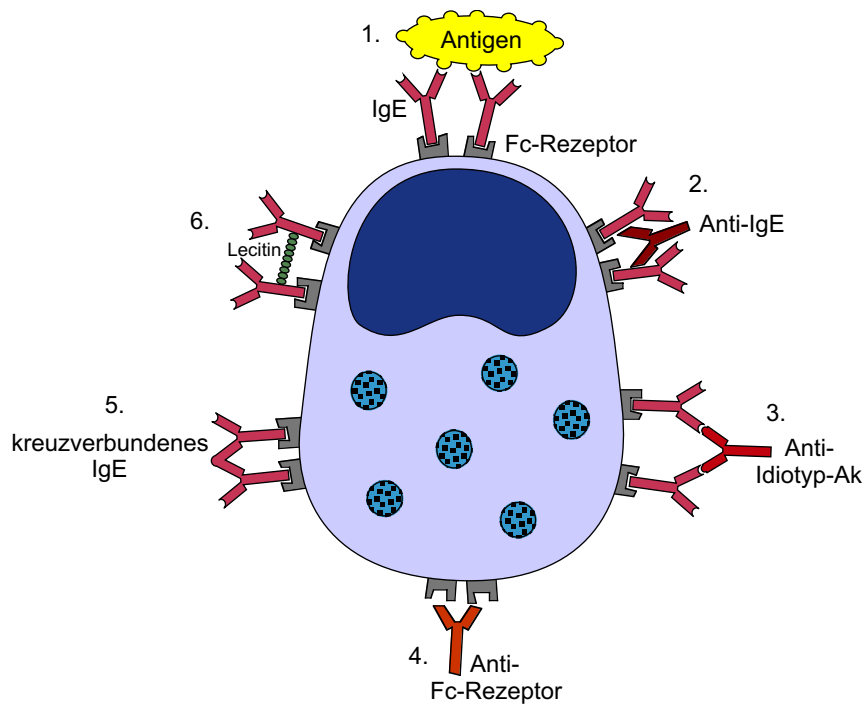
Als 1995 die Gruppe von M. Lichtenstein die molekulare Identifizierung des TCTP als Histaminfreisetzungsfaktor bekanntgab, kam dies überraschend (**MacDonald et al. 1995**), denn schon damals zeichnete sich ab, daß dieses Protein durch sein Vorkommen in Hefe und Pflanzen schlecht zum Bild eines physiologischen HRF paßte. Als alternative Erklärung bot sich an, daß es sich hierbei um die pathologische Reaktion einer allergisch prädispositionierten

Subpopulation von Patienten auf ein körpereigenes Protein handeln könnte. Die wesentlichen Ergebnisse der Arbeiten zeigen, daß etwa die Hälfte der Patienten einer Kindergruppe mit atopischer Dermatitis und Nahrungsmittelunverträglichkeiten auf TCTP mit einer Histamin- und IL-4 Sekretion reagierten. Dieser Effekt wurde durch basophile Granulozyten und Mastzellen in Verbindung mit IgE vermittelt.

Die nachfolgenden Abschnitte sollen einen Überblick über IgE-abhängige und IgE-unabhängige Histaminfreisetzungsmechanismen geben.

Histamin gehört zu den mediatorisch wirksamen Substanzen. Seine Freisetzung führt zur Vasodilatation der kleinen Gefäße und zu erhöhter Gefäßpermeabilität. An der Bronchialmuskulatur kommt es Rezeptor-H1-vermittelt zu einer Kontraktion, als dessen Folge asthmatische Beschwerden auftreten.

Mastzellen und basophile Granulozyten sind als spezialisierte Zellen des Immunsystems in der Lage, Histamin auf vielerlei Stimuli hin auszuschütten. Diese lassen sich in zwei Gruppen untergliedern: in IgE abhängige und IgE unabhängige Mechanismen. Zu den IgE unabhängigen Mechanismen gehören unter anderem die Anaphylatoxine C3a und C5a, welche als Spaltprodukte des Komplementsystems bekannt sind, ferner Ca-Ionophore, Mellitin, Leukotriene, Compound 48/80 sowie einige Pharmaka, wie synthetisches ACTH, Codein und Morphin. In der Gruppe der IgE abhängigen Mechanismen kommt es nach Kreuzvernetzung von membranständig gebundenen IgE Molekülen zu einer Degranulation und damit Histaminausschüttung (Abb. 2-3).



**Abb. 2-3 IgE-abhängige Arten der Freisetzung von Histamin und anderen Mediatoren aus Mastzellen und basophilen Granulozyten.**

Produktionsstätte der Immunglobuline vom Typ IgE sind Plasmazellen. Damit es zu einer Bildung kommt, muß ein Kontakt mit dem Antigen (z.B. Oberflächenproteine von Parasiten) vorausgegangen sein. Antigenpräsentierende Zellen wie zum Beispiel Makrophagen sind in der Lage, die bei der unspezifischen Abwehr von Mikroorganismen und Parasiten anfallenden Abbauprodukte zu prozessieren und auf ihrer Oberfläche im Komplex mit MHCII zu präsentieren. Dieser Komplex wird von spezifischen T-Helferzellen erkannt und kann zu einer Stimulation von ebenfalls für dieses Antigen Bindungsstellen aufweisende B-Lymphozyten durch Interleukine führen. Erst dann kommt es zur klonalen Differenzierung und Proliferation. Es entstehen sowohl Gedächtniszellen als auch Plasmazellen. In der Anfangsphase der Immunantwort dominieren Ig vom Typ IgM. Später erfolgt eine Umschaltung der Expression der verschiedenen Klassen von Immunglobulinen, die die Bildung von IgG, IgA oder IgE zur Folge hat. Alle Antikörpersubklassen nehmen spezialisierte Aufgaben im Organismus wahr, wobei die Hauptaufgabe des IgE in der Bekämpfung von Wurmparasiten vermutet wird. IgE hat selbst nur eine kurze Halbwertszeit. Auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten vermag es über Fc-Rezeptoren, die in hochaffiner Form praktisch nur dort vorkommen, in gebundener Form lange Zeit zu überdauern. Werden derart gebundene Ak mit Antigen kreuzvernetzt kommt es zur Degranulation. Denselben Effekt haben Anti-IgE Ak oder



Antiidiotyp-Ak. Die Rezeptoren können auch direkt mit Antirezeptorantikörper kreuzvernetzt werden. Ebenso führt kovalent verbundenes IgE zu einer Überbrückung der Rezeptoren. Eine weitere Möglichkeit der IgE-abhängigen Stimulation bieten Lectine. Diese Stoffe pflanzlicher Herkunft erkennen spezifische Glykosylierungsmuster an Proteinen und binden daran. So läßt sich möglicherweise die Urtikaria nach dem Genuß von Erdbeeren erklären.

Richtet sich die IgE abhängige Immunabwehr nicht gegen Parasiten, sondern gegen harmlose Antigene aus der Umwelt, spricht man von der Überempfindlichkeit vom Typ I bzw. "Allergie". Praktisch jedes Antigen scheint dafür in Frage zu kommen. Die klinische Symptomatik reicht von Hautrötung, Dermatitis, Urtikaria, Rhinitis, Heufieber, Konjunktivitis, Juckreiz, Asthma, Nahrungsmittelunverträglichkeit bis hin zum anaphylaktischen Schock. Treten mehrere Symptome gleichzeitig auf, spricht man auch von "Atopie". Dieser Begriff wurde erstmals 1916 geprägt, (**Cooke und Vander-Veer 1916**) wobei auch eine genetische Disposition der Erkrankten auffiel.

Im Zusammenhang mit der TCTP-gekoppelten Freisetzung von Interleukinen aus Mastzellen und basophilen Granulozyten stellt sich die Frage, worauf die IgE-Abhängigkeit beruhen könnte. Einige der in Abb. 2-3 dargestellten Möglichkeiten sind von **MacDonald et al. 1995** kritisch diskutiert bzw. experimentell überprüft worden. Demnach sind spezifisch glykosylierte Immunglobuline nicht die Ursache der Histaminfreisetzung (**Kleine-Tebbe et al. 1996**). Die Möglichkeit des Auftretens von IgE-Ak, die gegen Epitope des TCTP gerichtet sind (Nr. 1 der Abb. 2-1), wurde eingeräumt. Im konkreten Fall käme dies einem Modell einer autoimmun-allergische Reaktion gleich. Von betroffenen Individuen würde man eine ständige Aktivierung des IgE-abhängigen Immunsystems, wie es bei vielen Atopikern vorkommt, erwarten. Über den Zusammenhang zwischen Erkrankungen aus dem autoimmun-rheumatischen Formenkreis und Allergien ist erst wenig bekannt. Bei der Churg Strauß Arteriitis wurden Symptome beschrieben, die auf das Vorhandensein von Auto-Ak verschiedener Subtypen, IgE inklusive hindeuten.

Als andere Erklärung wurden IgE-Varianten ins Feld geführt, die durch alternatives Spleißen entstünden.

Durch die Tatsache, daß TCTP nicht nur intrazellulär sondern auch im Plasma vorkommt und auch extrazellulär als HRF wirkt, stellt sich die Frage, ob es durch spezifische Mechanismen

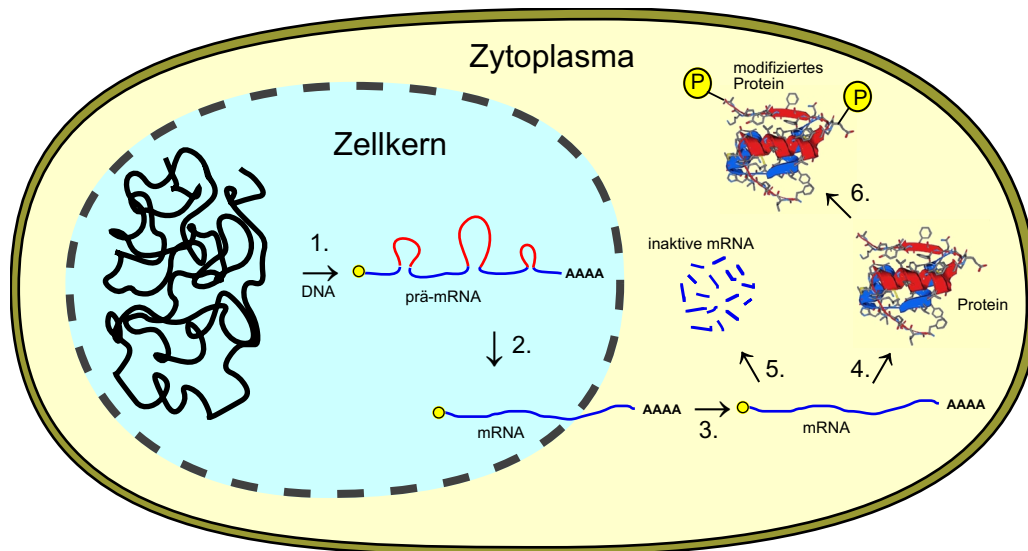
sezerniert wird. Proteinchemische Untersuchungen zeigen keinerlei Anhalte für entsprechende Signalsequenzen. **Mac Donald et al.** gelang die Isolierung des Proteins aus dem Serum (**MacDonald et al. 1995**). Die Tatsache, daß große Mengen dafür notwendig waren (50 Liter!) lassen auf geringe Serumkonzentrationen schließen. Eine Erklärung wären unspezifische Zelluntergänge. Diese führen immer zum Einschwemmen kleiner Mengen intrazellulärer Proteine in die Blutbahn. Auf diesem Prinzip beruhen die klinischen Diagnosen von Gewebeschäden, wie sie etwa bei Herzinfarkten oder Lebererkrankungen auftreten. Nielsen et al. konnten indes zeigen, daß die Konzentration von TCTP im Plasma selektiv höher als die von anderen intrazellulären Proteinen ist, die zum Vergleich bestimmt wurden. Dies läßt doch auf einen spezifischen bisher nicht erkannten Freisetzungsmechanismus schließen (**Nielsen et al. 1998**). Unterstellt man dem TCTP eine Funktion im Zytoskelett der Zelle, so muß auch eine Beteiligung dieses Proteins am Zustandekommen des Vesikeltransportes oder der Exozytose als Möglichkeit in Betracht gezogen werden. Diese Vorgänge laufen in Zellen gerichtet an Mikrotubuli und Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) ab.

## **2.2 Die verschiedenen Ebenen der Expressionskontrolle**

Man kann heute davon ausgehen, daß alle Vorgänge in den Zellen in irgendeiner Art und Weise kontrolliert oder reguliert werden. Die verschiedenen Ebenen der Regulationen getrennt zu beschreiben, geschieht oft aus didaktischen Gründen, da viele Regelkreise ineinander verflochten sind und sich gegenseitig beeinflussen. Die Regulation der Expression der Proteine nimmt diesbezüglich eine Schlüsselstellung ein. So bilden sie den Hauptteil der katalytischen Aktivität der Zellen, sind an vielen strukturellen Funktionen beteiligt und agieren als Hauptakteure molekularer Erkennungsvorgänge. In dieser Funktion sind sie wiederum die Vermittler der Expressionsregulation anderer Proteine. Dabei spielen oft Protein-DNA, Protein-Protein oder Protein-RNA Wechselwirkungen eine Rolle.

Auf welchen Niveaus die Proteinmenge kontrolliert wird, zeigt Abb. 2-4. Als erstes kann die Zelle festlegen, wann und wie oft ein bestimmtes Gen transkribiert wird (Transkriptionskontrolle). Als nächstes kann Einfluß auf das Spleißen der prä-mRNA sowie sonstiger Modifikationen genommen werden (Processing-Kontrolle). Weitere Kontrollmöglichkeiten bietet der Vorgang des Ausschleusens der mRNA aus dem Zellkern

(Transportkontrolle), die Einflußnahme auf translationelle Vorgänge, etwa durch Aktivierung oder Inaktivierung von mRNPs (Translationskontrolle), die Geschwindigkeit des mRNA-Abbaus durch stabilisierende und destabilisierende Veränderungen der mRNA oder die Möglichkeit, selektiv spezifische Proteinmoleküle nach ihrer Synthese zu aktivieren, inaktivieren oder räumlich abzugrenzen (Proteinaktivitätskontrolle).



**Abb. 2-4 Verschiedene Kontroll-Ebenen der Expressionskontrolle in einer schematisierten Zelle:** 1. Transkription 2. RNA-Prozessing 3. RNA-Transport 4. Translation 5. mRNA-Stabilität 6. Proteinaktivität (Alberts et al. 1995).

## 2.3 Die Regulation der Transkription

### 2.3.1 Der Aufbau eukaryontischer Gene

Typische Eukaryontengene zeigen einen modularen Aufbau. Dabei unterscheidet man zwei Sorten von Modulen. Die eine Sorte besteht aus kodierenden Sequenzen, die man als Exons bezeichnet. Ihre Länge beträgt in der Regel etwa 50 bis 200 bp. Sie stellen die eigentlichen Informationsträger der Proteinsequenzen dar. Oftmals kodieren Exons für funktionell abgrenzbare Proteindomänen bzw. Sekundärstrukturen. Die andere Sorte Module besteht aus kurzen DNA-Sequenzen, die der Transkriptionsregulation dienen. Diese Sequenzen verteilen sich in der Genkontrollregion und sind die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (TF).

Die zwischen den Exons liegenden Sequenzen werden als Introns bezeichnet. Ihre Länge kann mehrere kb überschreiten und ist großen Schwankungen unterworfen. In einem als Spleißen

bezeichneten Prozeß werden diese intronischen Sequenzen aus dem Primärtranskript mit Hilfe eines Multienzymkomplexes (Spleißosom) entfernt. Dabei werden konservierte Bereiche im Intron/Exon-Übergang und innerhalb der Introns als Erkennungsstellen benutzt. Die wahlweise Benutzung des einen oder anderen Spleißortes, auch als alternatives Spleißen bezeichnet, führt durch unterschiedliche Exonzusammensetzungen zu Veränderungen in der Proteinsequenz. Dieses Prinzip wird nur von manchen Genen benutzt (**Mazarakis et al. 1996**). In den meisten Fällen haben Introns keine weiteren Funktionen, jedoch sind Fälle bekannt, in denen komplette andere Gene in Introns enthalten sind (**Levinson et al. 1990**), oder Transkriptionsfaktorbindungsstellen in Introns gefunden wurden (**Sun und Means 1995**). Als Gegenstück zu Introns läßt sich Spacer-DNA betrachten. Sie verbindet die einzelnen Module der Genkontrollregionen miteinander, ohne eine besondere Funktion inne zu haben.

Der modulare Aufbau der eukaryontischen Gene macht Sinn, wenn man bedenkt, daß durch Insertion oder Deletion von einzelnen Modulen eine schnelle und effiziente Möglichkeit der regulativen und funktionellen Neuorganisation des Genomes realisierbar ist. Damit wären Eukaryonten in der Lage gewesen, sich schnell an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Introns bei Prokaryonten sind außergewöhnlich selten (**Daniels et al. 1985**). Man vermutet, daß sie unter dem evolutionären Druck ihre Genome klein zu halten, diese Sequenzen verloren haben. Somit stellt das eukaryontische System der Genorganisation das phylogenetisch ältere Modell dar (**Alberts et al. 1995**).

### ***2.3.2 Prinzipien der Transkriptionsregulation***

Der Transkriptionsregulation kommt hinsichtlich der Steuerung der Expression in allen Organismen eine wichtige Rolle zu. Als erster Schritt in der Entstehung von Proteinen kann hier die sinnlose Synthese von Zwischenprodukten verhindert werden. Gerade für Prokaryonten war dies ein starker Selektionsfaktor in der Evolution. Andererseits ist dieses System der Regulation relativ träge. Veränderungen der Transkriptionsrate bewirken erst mit einer gewissen Latenz eine Änderung der Proteinkonzentration. Deshalb eignet sich die Transkriptionsregulation besonders für Grundsatzentscheidungen einer Zelle, den einen oder anderen Satz an Proteinen zu synthetisieren.

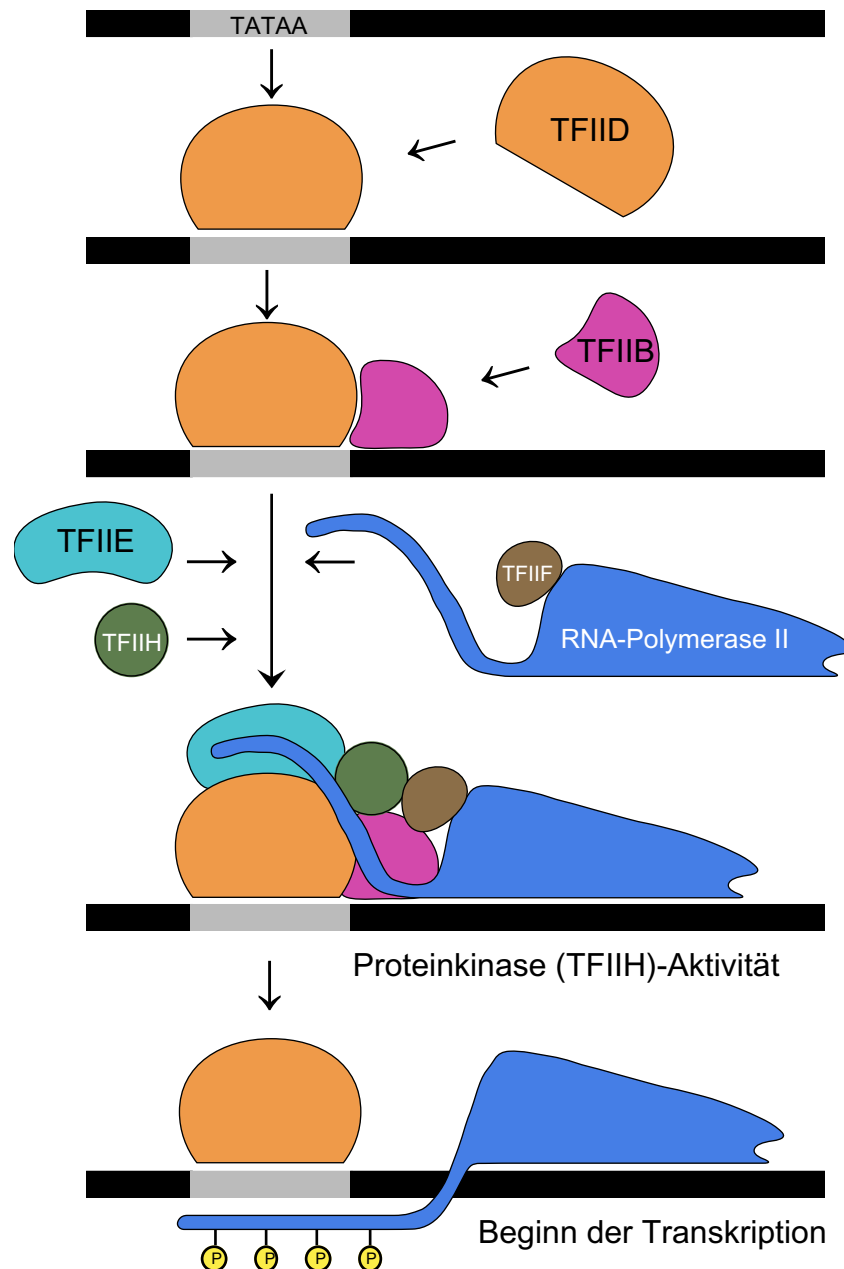
Frühe Erkenntnisse stammten aus der Erforschung von Prokaryonten, die die Erkenntnis brachten, daß Gene durch regulatorische Sequenzen in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes kontrolliert werden. Diese relativ kurzen Sequenzen interagieren mit Proteinen, sogenannten Transkriptionsfaktoren (TF) und entscheiden über eine An- oder Abschaltung von Genen sowie der Geschwindigkeit und der Häufigkeit der Transkriptionsinitiation.

Eine Möglichkeit diese Faktoren zu klassifizieren besteht in der Beschreibung ihrer Bindungsmotive, von denen sich bis heute im wesentlichen sechs verschiedene herauskristallisierten. Dies sind das Helix-Turn-Helix-Motiv, das Homöodomänen-Motiv, das Zinkfinger-Motiv, das  $\beta$ -Faltblatt-Motiv, das Leucin-Zipper-Motiv und das Helix-Loop-Helix-Motiv. Eine charakteristische Eigenschaft vieler TF ist die Bildung von Homo- und Heterodimeren (Alberts et al. 1995).

Nach der Bindung der Faktoren an ihre spezifischen DNA-Sequenzen wechselwirken sie mit dem Transkriptionsinitiationskomplex. Dieser besteht bei Prokaryonten aus der Polymerase in Verbindung mit verschiedenen  $\sigma$ -Faktoren, bei Eukaryonten aus einem Satz allgemeiner TF inklusive der Polymerase, die an einem spezifischen, sequenzdeterminierten Ort (meistens der TATA-Box) bindet. Dieser Komplex wird als Promotor bezeichnet. Das heutige Modell favorisiert die These, daß spezifische TF die Ansammlung von allgemeinen TF beschleunigen, indem sie zusätzliche Bindungsstellen anbieten (Enhancer) oder verlangsamen, indem sie den Aufbau des Komplexes allgemeiner TF stören (Silencer).

### **2.3.3 Allgemeine Transkriptionsfaktoren**

Als man begann, die Promotoren der eukaryontischen Gene zu analysieren, stieß man auf eine AT-reiche Konsensussequenz um die Position -30, die man nach der Sequenz als TATA-Box bezeichnete. Dieses Element ist eine Komponente der überwiegenden Mehrzahl aller Promotoren, die von der Polymerase II verwendet wird. Ausgehend von der Erkenntnis, daß gereinigte Polymerase II nicht in der Lage war, die Transkription zu initialisieren, isolierte man nach und nach die Faktoren, welche zusätzlich erforderlich waren. Die Abb. 2-5 zeigt, wie der Komplex aus Polymerase und TF vermutlich gebildet wird (Alberts et al. 1995).



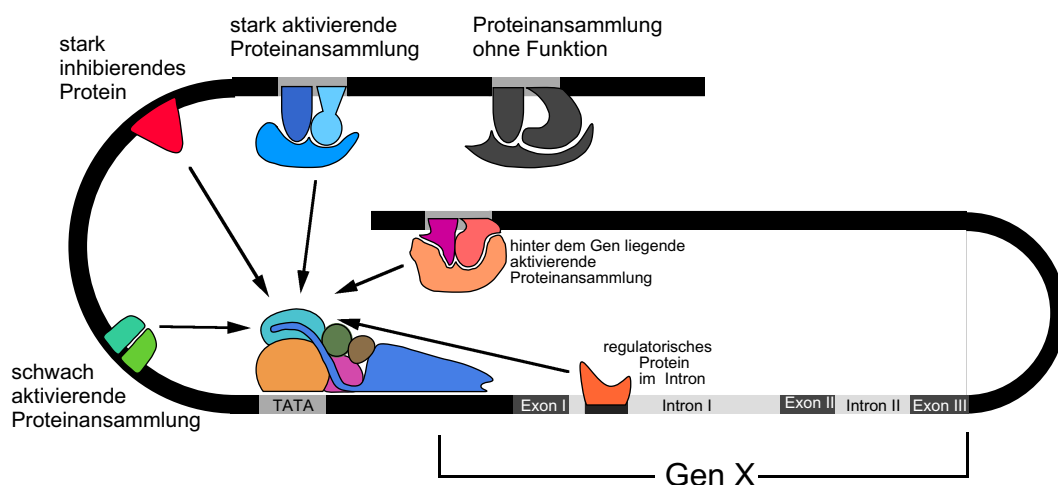
**Abb. 2-5 Ansammlung allgemeiner TF am Promotor.**

In einer sequenziellen Abfolge binden verschiedene Faktoren nacheinander an der TATA-Box. Zuerst bindet der Faktor TFIID, danach TFIIB, TFIIE, TFIIH und der Komplex aus Polymerase II und TFIIF an dem DNA-Motiv. Durch die Proteinkinaseaktivität des Faktors TFIIH wird eine Untereinheit der Polymerase phosphoryliert und damit für die Transkription aktiviert.

### 2.3.4 Spezielle Transkriptionsfaktoren

Die Geschwindigkeit mit der diese Prozesse in vivo ablaufen, ist ohne spezielle TF vernachlässigbar. Erst durch sie wird die Ansammlung allgemeiner TF auf meßbare Werte

gesteigert. Diese speziellen TF binden an Regulator-Sequenzen. Als Genkontrollregion bezeichnet man den Promotor inklusive Regulator-Sequenzen. Diese Region beschränkt sich bei der Mehrzahl der gefundenen Gene auf einen stromaufwärts gelegenen Bereich von etwa -500 bp. Beschrieben wurden jedoch auch Regulator-Sequenzen in großer Distanz zum Promotor (Tuan et al. 1989) innerhalb eines der Introns (Sun und Means 1995) oder stromabwärts des Gens (Stamatoyannopoulos et al. 1997). Abb. 2-6 stellt den Versuch dar, die Fernwirkung der Regulator-Sequenzen und der mit ihnen wechselwirkenden TF durch Schleifenbildung der DNA zu erklären (Alberts et al. 1995).



**Abb. 2-6 Modell der Gen-Kontrollregion eines eukaryontischen Gens:** Modular aufgebaute Regulator-Sequenzen stromaufwärts, stromabwärts oder innerhalb eines Introns binden spezielle TF. Diese wechselwirken mit dem Promotor (TATA-BOX, allgemeine TF und Polymerase) auf direktem Wege oder durch Fernwirkung nach Schleifenbildung der DNA. Die Summe aller inhibierenden und aktivierenden Signale integriert sich zu einer Transkriptionsaktivität, die von dem Vorhandensein, der Aktivierung und der Konzentration der beteiligten TF abhängt.

Eine heute im Zentrum der Forschung stehende Frage ist, auf welche Weise die Regulatorproteine mit dem Promotor wechselwirken. Wie schon erwähnt, findet der Zusammenbau des Transkriptionskomplexes am Promotor sequenziell statt, und jeder einzelne Schritt kann theoretisch beeinflusst werden. Der Transkriptionsfaktor GAL4 der Hefe überwindet vermutlich die zeitlimitierende Anlagerung des TFIIB an den TFIID durch gleichzeitige Bindung an beide Faktoren. Weil dem TFIIB nun zwei unabhängige Bindungsstellen zur Verfügung stehen, ist die Reaktion kinetisch begünstigt. Der Faktor GAL4 ist auch ein gutes Beispiel für den modularen Aufbau der TF. Zwei Sekundärstrukturen, eine für die Bindung an die Regulator-Sequenzen und eine für die Bindung an die allgemeinen TF (saure

Aktivierungsdomäne), konnten als wechselwirkende Domänen durch Protein-Hybrid-Experimente eindeutig bestimmt werden (Alberts et al. 1995).

Die Möglichkeiten, die in dem von Eukaryonten verwendeten System der Transkriptionsregulation liegen, sind äußerst vielgestaltig und können die Grundlage für sehr komplexe genetische Schalter liefern. Ein Beispiel dafür ist das even-skipped (*eve*)-Gen von *Drosophila*. In einem frühen Embryonalstadium der Fruchtfliege wird das Genprodukt des *eve*-Gens in sieben Streifen innerhalb des einzellig-mehrkernigen Embryos exprimiert. Erreicht wird dies durch den sieben Streifen entsprechende Genregulator-Module. Diese Module verteilen sich auf einer Länge von 20 kb, binden zusammen etwa 20 TF und arbeiten unabhängig voneinander. Sie integrieren die Konzentration von anderen TF, die sich innerhalb der Zelle gradientenförmig verteilt haben. Das Streifen-2-Modul wird zum Beispiel durch zwei inhibierende Faktoren (bicoid und hunchback) und zwei aktivierende Faktoren (Krüppel und giant) beeinflusst. Nur an einer Stelle im Embryo liegen die TF in den Konzentrationen vor, so daß die Transkription aktiviert wird. Analoges gilt für die anderen Streifenmodule (Alberts et al. 1995).

## 2.4 Die Entstehung von Pseudogenen

Die Suche nach dem Gen des TCTP gestaltete sich schwierig, da sich zahlreiche *TPT1*-homologe Sequenzen im Genom des Kaninchens verteilten, wie im Verlauf der Arbeit gezeigt werden wird. In allen untersuchten Fällen handelte es sich hierbei um prozessierte Pseudogene. Die Tatsache, daß sowohl bei der Maus, (Bommer, persönliche Mitteilung) als auch beim Menschen derartige *TPT1*-Pseudogene vorkommen (Kap. 5.4), sprechen für eine generelle Verbreitung bei Säugern.

Prozessierte Pseudogene entstehen, wenn genetische Information von der RNA zum Genom zurückfließt. Die Frage auf welche Weise dies geschieht und woraus die restlichen 90% des Genoms, die nicht für Proteine kodieren bestehen, ist Gegenstand der folgenden Kapitel.

### 2.4.1 Die Organisation und Evolution des Kern-Genoms

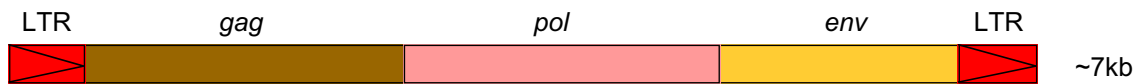
Erste Erkenntnisse über den Aufbau und die Zusammensetzung der Kern-DNA lieferten Experimente über die Geschwindigkeit der Reassoziierung von geschmolzener Maus-DNA



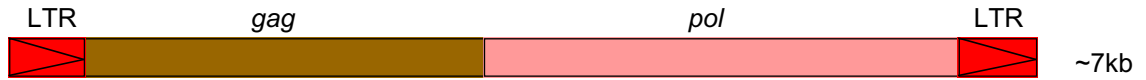
(**Britten und Kohne 1968**). Sie zeigten, daß etwa 70% des Genoms aus singulären Sequenzen bestanden. In diese Gruppe fallen die kodierenden Sequenzen, Introns, regulatorische Elemente sowie prozessierte und nicht prozessierte Pseudogene. Der Rest reassozierte sehr viel schneller. Dies konnte man sich durch die Annahme von ständigen Wiederholungen der selben Sequenz erklären. Etwa 10% der Sequenzen bestehen aus kurzen Stücken von weniger als 10 bp, die sich millionenfach wiederholen und werden als hochrepetitiv bezeichnet werden. Der Rest, etwa 20%, ist mittelrepetitiv und kommt in Kopienzahlen von mindestens 1000 vor. Einen erheblichen Anteil an der hochrepetitiven DNA macht sogenannte Satelliten DNA aus. Möglicherweise steht sie im Zusammenhang mit Centromeren und Telomeren (**John und Miklos 1979**).

Bei dem Versuch, die sogenannte mittelrepetitive DNA näher zu charakterisieren, stieß man auf zahlreiche, heute als Retroelemente bezeichnete Sequenzen (Abb. 2-7). Ihre Anwesenheit erklärt man sich durch Retrotransposition, d.h. ihre Bildung und Transposition erfordert neben einem RNA-Intermediat eine reverse Transkriptase-Aktivität. Zu den Retroelementen zählt man Retroviren und Retrotransposons, die über LTR-Elemente verfügen, sowie LINE- und SINE-Elemente, die dieses Merkmal nicht besitzen. All diese Elemente werden aktiv transkribiert und über verschiedene Mechanismen wieder reintegriert. Somit ist also eine Vermehrung möglich, die zu den beobachteten Kopienzahlen führt. Alu-Elemente machen z.B. als Vertreter der SINE 1-3% des Humangenoms aus. Prozessierte Pseudogene sind ebenfalls durch Retrotransposition entstanden, werden aber nicht transkribiert und vermehren sich nicht. Deshalb fallen ihre Kopienzahlen im Genom weitaus niedriger aus.

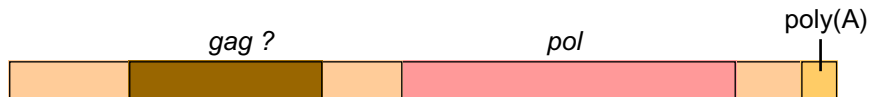
(A) integrierter Retrovirus - allgemeine Struktur



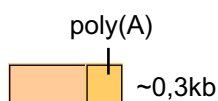
(B) Ty-Element (Hefe)-Transposon



(C) LINE

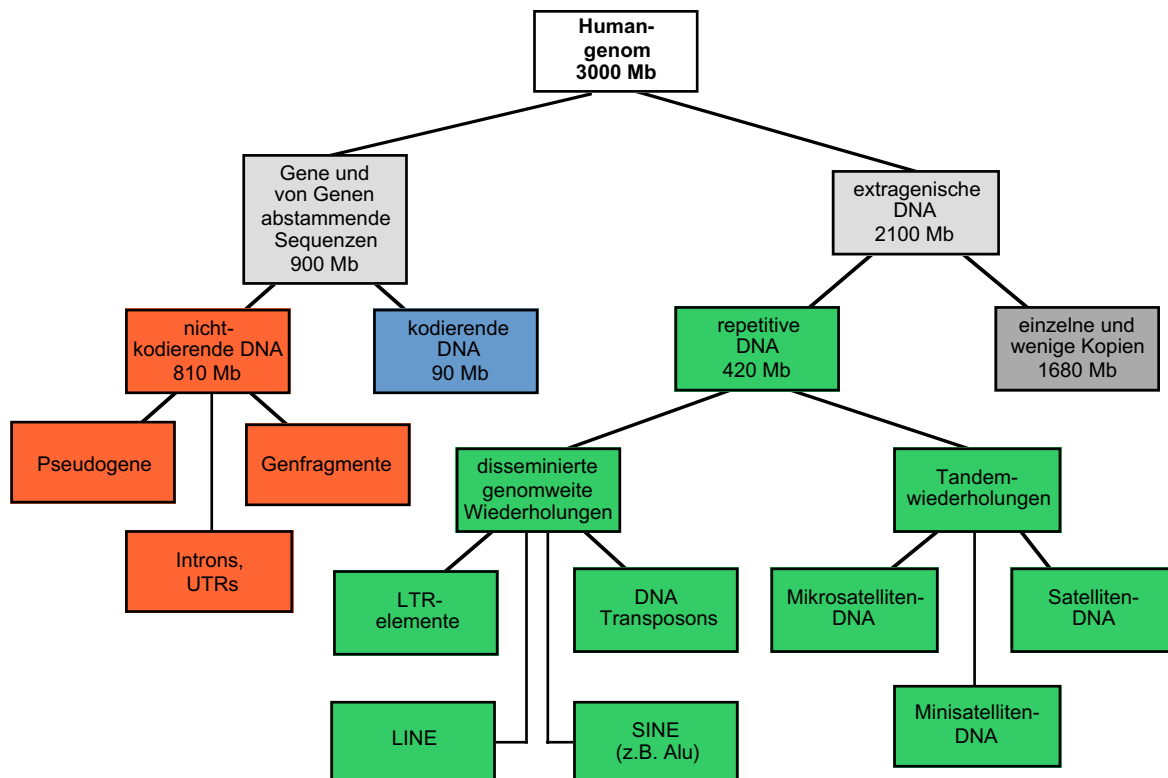


(D) SINE



**Abb. 2-7 Vergleich verschiedener Retroelemente:** Retroviren und Retrotransposons werden von LTR-Elementen flankiert, die für den Einbau ins Genom verantwortlich sind. Die Gene *gag* und *env* kodieren für virale Strukturproteine, und das *pol*-Gen für eine reverse Transkriptase. SINE und LINE sind nicht-LTR Retroelemente oder Retroposons. Sie besitzen einen poly(A)-Schwanz an ihrem Ende.

Die Abb. 2-8 stellt die wesentlichen Inhalte des Humangenoms und die ungefähren Größenrelationen der einzelnen Kategorien in schematischer Form dar (**Brown 1999**).



**Abb. 2-8 Die Organisation des Humangenoms (Brown 1999)**

Unter evolutionären Gesichtspunkten scheinen Retrotransposons eine starke Quelle genomischer Neuorganisation darzustellen. So wurde beispielsweise in Maispflanzen ein plötzlicher Transpositionsausbruch mehrerer transponierbarer Elemente beobachtet (**Coen und Carpenter 1986**). In *Drosophila melanogaster* beobachtete man ähnliche Ausbrüche bei dem Versuch, unterschiedliche Stämme zu kreuzen (**O'Kane und Gehring 1980**). Das Phänomen wurde als hybride Dysgenese bekannt. Zumindest bei Pflanzen scheint Umweltstress ein Auslösemechanismus für Transpositionseruptionen zu sein. Da der Positionswechsel der Transposons ungerichtet geschieht und zu zahlreichen Mutationstypen wie Insertionen, Deletionen usw. führt, ist mit erheblichen Folgen für den Organismus zu rechnen. Beim Menschen sind LINE - Elemente (L1) beispielsweise für Hämophilie A und Brustkrebs verantwortlich gemacht worden (**Kazazian et al. 1988, Morse et al. 1988**).

#### **2.4.2 Prozessierte Pseudogene**

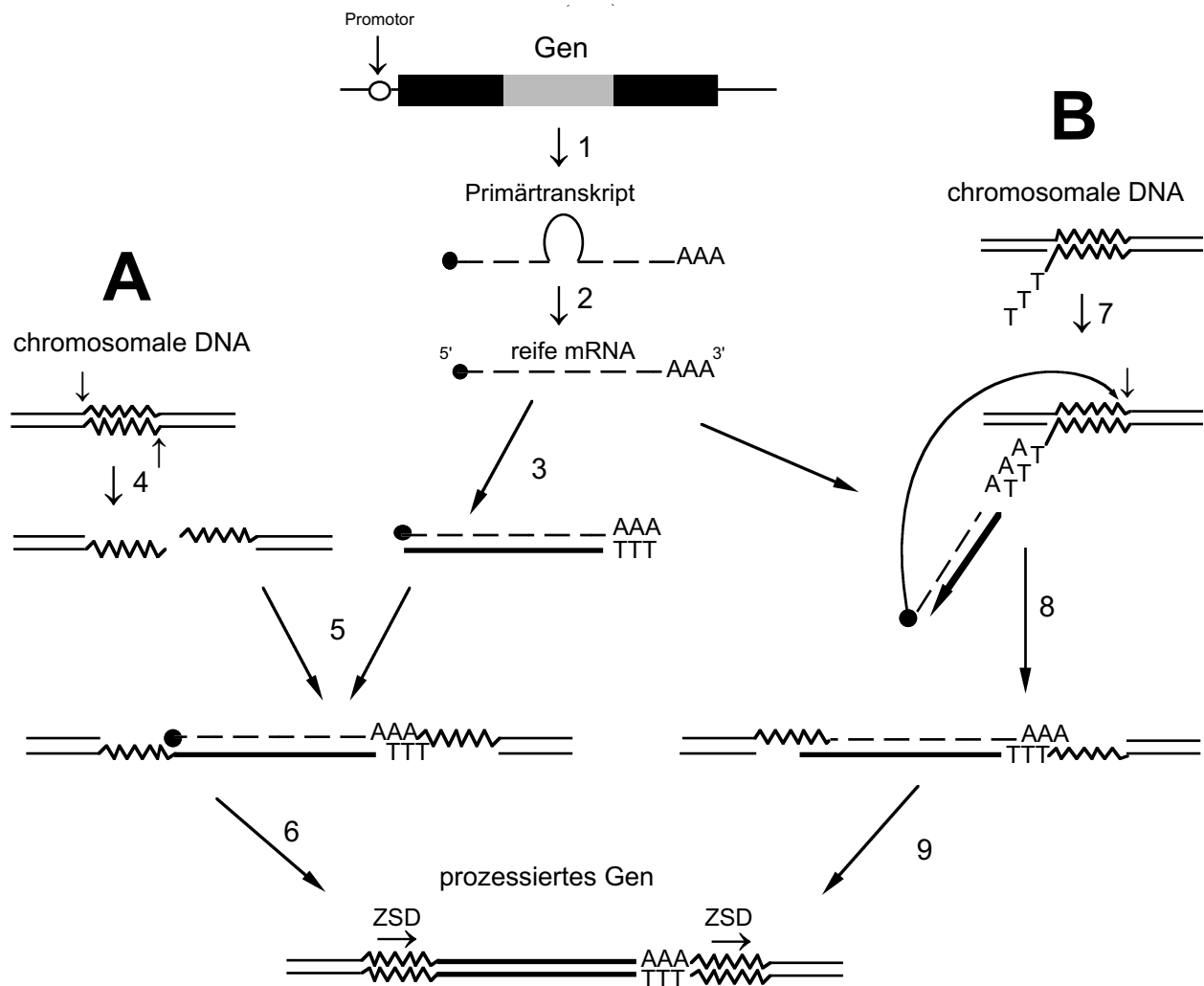
Im Jahre 1977 entdeckten Jacq und seine Mitarbeiter (**Jacq et al. 1977**) die Gensequenz einer 5S rRNA mit verkürztem 5'-Ende und zahlreichen weiteren Mutationen. Dieser DNA Bereich konnte unmöglich für ein funktionelles 5S RNA Molekül kodieren und wurde deshalb als "Pseudogen" bezeichnet. Nachfolgend wurden eine Vielzahl weiterer Pseudogene entdeckt. Schnell erkannte man, daß sich Pseudogene in zwei Gruppen einordnen ließen, prozessierte Pseudogene, die keine Introns enthalten und nicht prozessierte Pseudogene, die ihre Intron/Exon-Architektur behalten haben. Beispiele für nicht prozessierte Pseudogene sind zahlreiche humane Globinpseudogene oder die Sojabohnen Leghämoglobinfamilie (**Vanin 1995**).

Zur Gruppe der prozessierten Pseudogene gehören z.B. die Gene für das humane ribosomale Protein L7, das Tumorsuppressorprotein p53 oder das menschliche Betatubulin (**Weiner et al. 1986**). Neueste Beispiele wären der Proteininhibitor der neuronalen Stickstoffoxid-synthase des Kaninchens (**Jeong et al. 1998**), die gastrointestinale Glutathionperoxidase der Maus (**Tsuji et al. 1998**) oder die zytosolische Serin-hydroxymethyltransferase (**Devor et al. 1998**).

Die Liste ließe sich beliebig fortsetzen, da laufend neue Pseudogene entdeckt werden. Prozessierte Pseudogene sind durch mehrere Eigenschaften charakterisierbar, sie zeigen Homologie zur mRNA Sequenz des dazugehörigen funktionellen Gens, haben keine Introns,

besitzen eine A-reiche Sequenz an ihrem 3' Ende und werden beidseits von kurzen direkten Wiederholungssequenzen flankiert (direct repeats oder ZSDs). Diese 7-17 bp aufweisende Sequenz steht wahrscheinlich in direktem Zusammenhang mit der Insertion der Pseudogene in das Genom der Zelle.

Die folgende Abbildung (Abb. 2-9) zeigt zwei Modelle für die Genese von prozessierten Pseudogenen (Jeffreys und Harris 1984, Bernstein et al. 1983, Rogers 1985).



**Abb. 2-9 Modell zur Entstehung von prozessierten Pseudogenen (Jeffreys und Harris 1984):** Ein Gen wird primär transkribiert (1) und durch Spleißen und Polyadenylierung in die reife mRNA Form überführt (2). Modell **A** (Bernstein 1983) sieht vor, daß die mRNA unter Benutzung von oligo(dT) als Primer revers transkribiert wird. Eine Topoisomerase I führt zwei Einzelstrangbrüche in die genomische DNA ein, (4) in welche das RNA/DNA-Hybrid kovalent eingebaut wird (5). Entfernung der RNA und Reperaturprozesse (6) generieren das Pseudogen. Modell **B** (Rogers 1984) beschreibt die Möglichkeit, daß ausgehend von einem Einzelstrangbruch die Aktivität einer terminalen Transferase zu (dT) reichen Einzelstrangüberhängen führt, die ihrerseits als Primer für die cDNA-Synthese dienen (7). Ein weiterer Einzelstrangbruch (8) und Reparaturen (9) generieren das durch Zielsequenzduplikationen (ZSD) flankierte prozessierte Pseudogen.

Ein strittiger Punkt ist auch heute noch der Ursprung der reversen Transkriptaseaktivität. Wie schon erwähnt, kodieren die pol Gene der Retroviren und Retrotransposons für eine reverse Transkriptase. Sie könnten demnach für die Enzymaktivität verantwortlich sein.

Andererseits sind Retropseudogene in *Drosophila* sehr selten (**DiNocera und Dawid 1983**) und in Hefe unbekannt, obwohl Retrotransposons beschrieben wurden. Endogene und exogene Retroviren sind ebenso für eine Vielzahl von Spezies nachgewiesen worden, unter anderem in Vögeln, für die es nur einen Fall eines beschriebenen prozessierten Pseudogens gibt (**Stein et al. 1983, Chien und Dawid 1984**).

Eine Erklärung dafür könnte in den Unterschieden der Gametogenese der verschiedenen Spezies liegen. (**Weiner et al. 1986**). Diese liegen vor allem in der Oogenese, während die Spermatogenese kaum Unterschiede zeigt. Eine Besonderheit der Oogenese der Säuger ist die bis zu 40 Jahren dauernde Prophase I der Meiose. Bereits embryonal angelegte Oogonien differenzieren zu Oozyten, während die Meiose beginnt. Sie stoppt im Stadium der Prophase I und wird erst mit Erreichen der Geschlechtsreife beendet. Diese Phase dauert einige Monate bei Amphibien und weniger als drei Wochen bei Vögeln. Möglicherweise wird die Bildung von Retrotransposons durch die lange Prophase I der Meiose bei Säugern erst wahrscheinlich gemacht. Eine weitere Schlußfolgerung aus diesem Modell ist das Fehlen oder eine Unterrepräsentation von Pseudogenen in Y-Chromosomen. Auf jeden Fall sollten nur in der Keimbahn generierte Pseudogene vererbt werden. Generell sollte auch gelten, daß die Anzahl der Pseudogene mit der Menge der Transkripte korreliert, und daß nur oozytenspezifische oder in allen Geweben gebildete RNAs (Haushaltsgene) retrograd das Genom infiltrieren.

Für einige dieser Annahmen gibt es Hinweise. So besteht die Liste der bis jetzt gefundenen Pseudogene in der Tat in der Mehrzahl der Fälle aus Haushaltsgenen (**Wagner 1986**). Bei der Maus fand man von vornehmlich in Oozyten vorkommenden Isoformen des Cytochrom c drei Retropseudogene, dagegen keine hodenspezifischen Isoformen (**Linbach und Wu 1985**). Leider ist das vorliegende Datenmaterial noch nicht umfangreich genug, um statistisch gesicherte Aussagen machen zu können. In mindestens einem Fall ist z.B. ein Pseudogen auf einem Y-Chromosom beschrieben worden (**Frytag et al. 1984, Su et al. 1984**), jedoch ist die genaue chromosomale Kartierung der meisten Pseudogene bisher nicht erfolgt.

Ein anderer strittiger Punkt betrifft die Herkunft der Primer, die für Modell B der Abb. 2-9 notwendig wären. Verschiedene Vorschläge wurden dazu gemacht. Intrazelluläre rRNA oder tRNA Moleküle könnten als Primer dienen, Haarnadelstrukturen könnten ein "Selbstprimen" übernehmen, (**Bernstein et al. 1983**) oder der Einbau der RNA geschieht vor der reversen Transkription in die DNA an Stellen, die komplementär zu dem 3' oder 5' Ende der RNA sind (**Vanin 1985**). Genau wie Modell B der Abb. 2-9 kommt dieses Modell ohne Primer aus und würde den Einbau von Poly(A+) genauso wie Poly(A-) RNA erklären.

### **2.4.3 Nicht prozessierte Pseudogene**

Nicht prozessierte Pseudogene wurden in der Literatur wesentlich seltener beschrieben als prozessierte. Man kann jedoch noch keine abschließenden Bemerkungen zu diesem Faktum machen, da noch zu wenig Daten vorliegen. Auf jeden Fall folgt die Genese nicht prozessierter Pseudogene anderen Mechanismen als denen der prozessierten Pseudogene. Die übereinstimmende Meinung ist heute, daß nicht prozessierte Pseudogene durch Mutationen funktionslos gewordener Duplikaturen ehemals funktioneller Gene generiert werden. Ihre Existenz ist also nicht an die Bildung von RNA Intermediaten gekoppelt. Genau wie "richtige" Gene besitzen sie Introns, Exons und Promotorstrukturen. Viele nicht prozessierte Pseudogene sind in Multigenfamilien beschrieben worden. Dies ist wahrscheinlich kein Zufall. Ein plausibles Entstehungsmodell geht von Fehlbasenpaarungen während der Meiose aus. Bekanntlich kommt es während der Meiose zur Paarung homologer Chromosomen mit anschließendem crossing over. Hierbei kommt es an ausgewählten Stellen zur Paarung zweier homologer Chromosomen. Gerade in Bereichen von Multigenfamilien ist die Gefahr der Rasterverschiebung mit ungleichem crossing over gegeben, in deren Endergebnis Genduplikationen resultieren können (**Smith 1976**). Somit stellen Multigenloci einen Kondensationspunkt in der Entstehung neuer Pseudogene dar.

Die Grenze zwischen Genen und Pseudogenen ist jedoch nur sehr unscharf. Ein Gen kann durch Mutationen inaktiviert und ein Pseudogen durch Mutationen aktiviert werden. Für beide Mechanismen sind Beispiele im Globinlocus gefunden worden (**Jeffreys und Harris 1984**).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Geräte

Thermocycler .....	Biometra TRIO-Thermoblock
Hybridisierungssofen.....	MWG BIOTECH
Geigerzähler.....	Series 900 mini-monitor
Stromversorgungsgeräte.....	GIBCO, Consort, LKB
Zentrifugen.....	Sigma, Sorvall, Heraeus
Flüssigszintillationszähler.....	Wallac, LKB
Phosphorimager .....	Biorad
Transiluminator.....	AGS
Elektrophoresekammern .....	BRL, Pharmacia
Kamera.....	Polaroid
Laminarboxen .....	Antair
Speed-vac.....	Savant
Brutschränke .....	Heraeus
Wasserbäder.....	MGW-Biotech
Elektroporationsgeräte .....	Life Technologies, LKB
Photometer .....	Shimadzu
DNA-Sequencer.....	MGW Biotech, ABI Prism

#### 3.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad pro analysi.

Acetyl-Coenzym A.....	Boehringer Mannheim
Agarose .....	Serva
Ampicillin .....	Roth
Bacto Agar .....	Difco
BactoTrypton .....	Difco
Bacto Hefe.....	Difco
Borsäure .....	Roth
Bromphenolblau.....	Merck
BSA.....	Boehringer Mannheim
Chloroform.....	Baker
dATP, dCTP, dGTP, dTTP .....	Biolabs
DMEM .....	Gibco
DMSO .....	Merck
DTT.....	Sigma
EDTA.....	Serva
Ethanol .....	Baker
Ethidiumbromid .....	Ferak

FKS .....	Gibco
Glucose.....	Merck
Glycerin.....	Merck
HCl.....	Merck
Heringssperma-DNA.....	Boehringer Mannheim
KCl.....	Roth
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	VEB Laborchemie Apolda
Maltose.....	BDH
Methanol .....	Baker
MgCl <sub>2</sub> .....	Sigma
MgSO <sub>4</sub> .....	VEB Laborchemie Apolda
2-Mercaptoethanol.....	Serva
NaAc .....	Roth
NaCl .....	Roth
NaCitrat.....	Roth
NaOH .....	Roth
PEG 6000 .....	Roth
Phenol.....	Roth
SDS .....	Serva
Streptomycin .....	Serva
TRIS.....	Roth
X-Gal.....	AGS

### 3.1.3 Radiochemikalien

[ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP (3000-6000Ci/mmol).....	Amersham
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ] UTP (800 Ci/mmol).....	ICN
[1,2 C <sup>14</sup> ] Chloramphenicol (103 mCi/mmol).....	ICN

### 3.1.4 Synthetische Oligonukleotide

Name	5' Sequenz 3'	Position	Name	5' Sequenz 3'	Position
<b><i>TPT1- Gen Hinprimer Kaninchen</i></b>			<b><i>TPT1- Gen Rückprimer Kaninchen</i></b>		
P2301H	CTTTTCCGCCCGCTCCCC	1 U	P23R10	TGCTCTCCGAGAACTTCCCG	-531 P
P23H9	TCCGGGCTCCTGCAAGCTA	63 U	P23R11	TCTGGGTGCTTGTCTAACTC	-508 P
P23H5	TCTCCTACCAGCCGCCAT	98 U	P23R9	TAGCTTGGCAGGAGCCCGGA	63 U
P23Nco5'	TACCAGCCGCCACCATGGTT	103 UE	HMO-TAPR2	TCTTGTAGATGTCGGAGAAC	375 E2
P23H8	TCCGACATCTACAAGATCCG	379 E2	LX2R4	GATGAGCGAATCATCAATGT	964 E3
LX2H4b	ACATTGATGATTCGCTCATC	964 E3	LX2R3	CAATATCAACACCAGTGATC	1037 E3
P23H7	CAAGCACATCCTTGCTAA	1536 E4	P23I1R	GTATGCTCACATTGCTCAG	1267 I3
P23H6	GGTGAAAACATGAATCCAGA	2325 E5	HMO-TAPR1	CCATCTGGATTCATGTTTTTC	2328 E5
P23I3H	GGGCTTAGAATCTTGATTC	2628 I5	LX2R1	CATCTCTAAACCATCCTTA	2405 E5
P23648H	TGGATCTATCACTGCTCATC	3306 U	P23-635R	TTAACATTTTTCCATCTCTAA	2415 E5
P23H10	ACTTCAAGTGAGGCATTGT	3422 U	P23I3R	CAATCTGGGCTGCCACAA	3197 I5
P23H4	GAGAGAATGCCTATTAGT	3504 U	LX2R0	AGACAACCTACATGACAATG	3457 U
P23H11	CCTACAACGGAAGTAGCTAAC	3756 U	P23R1	TGTAGAAGTTATCTGAAG	3613 U
			P23R3	CAACTCAATCAGTCTCTC	3802 U



Name	5' Sequenz 3'	Position	Name	5' Sequenz 3'	Position
<b>TPT1-Gen/cDNA Hinprimer Mensch</b>			<b>TPT1-Gen/cDNA Rückprimer Mensch</b>		
hP23PromH	ATGCACCGGAATACAACCTG	?	P23-37R	CCAACCTCATATAGAGGGCA	-37 P
P23-37H	TGCCCTCTATATGAGGTTGG	-37 P	hP23-1R	AGGGGGGAGCGGGCGGAAAAG	1 E
hP23-293H	GAAGGTACCGAAAGCACAGT	292 E	hP23-333R	CTGCAGGTGATGGTTCATGA	332 E
hP23-I4H	TCCGGAAGTATCTTATGGCC	? I4	hP23-654R	TGATGACAGGTGATAGATCC	653 E
hP23-I4H2	GTGGTCTAAACCTTCCCTTG	? I4	hP23-U2R	CCACTGAATGAGTCTCTTTTT	1135 U
hP23-635H	CAAATGTGGCAATTATTTTG	634 E			
hP23-U2H	ATTTGAGAGAATGCCTTTTAG	851 U			

**Tabelle 1 Alle verwendeten TCTP/TPT1-Primer:** Die Positionen der Kaninchenprimer orientieren sich an der Lage im Gen, während sich die Positionen der humanen Primer, wo möglich, an der korrespondierenden cDNA orientiert. Alle Primer sind von 5' nach 3' angegeben. (U=UTR, E=Exonnummer, I=Intronnummer, P=Promotor, ?=genaue Positionsangabe derzeit nicht möglich)

*Zum Screening von Rekombinanten wurden folgende Primer verwendet:*

CAT3-H2 5' AGTCACGACGTTGTAAAACG 3' Position 367 bp im Vektor pBLCAT3

CAT3-R2 5' CCTTAGCTCCTGAAAATCTC 3' Position 479 bp im Vektor pBLCAT3

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma TIB Mol-Biol (Berlin) im Synthesemaßstab 0,2 µmol bezogen.

### 3.1.5 Enzyme, Kits und sonstiges

Restriktionsendonukleasen, Ligasen, Polymerasen, .....Boehringer, AGS, Biolabs, Fermentas  
 CIP, RNAsin, Proteinase K, Nukleasen .....Clontech, Invitrogen, MBI, Biolabs  
 PCR-Script™ Amp Cloning Kit.....Stratagene  
 Human monocyte cDNA library .....Clontech  
 Human RNA Master Blot™.....Clontech  
 P1-Bank gene discovery array.....Genome Systems  
 QIAquick PCR Purification Kit.....QIAGEN  
 QIAEX II Gel Extraction Kit.....QIAGEN  
 QIAGEN Plasmid Mini/Maxi Kits .....QIAGEN  
 QIAquick Nucleotide Removal Kit.....QIAGEN  
 Random Primed DNA Labeling Kit.....Boehringer  
 Hybond - N.....Amersham  
 Immobilon™ - N.....Millipore  
 Kodak BioMax MR film.....Kodak  
 Polaroid Polapan PRO 100 film.....Polaroid  
 DC-Plastikfolien 20 x 20 cm Kieselgel 60.....Merck  
 Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit .....Pierce

### 3.1.6 Soft- und Hardware

Diese Arbeit wurde auf einem Macintosh Computer (Power Macintosh G3) realisiert. Als Textverarbeitung kam Microsoft Office 98 zum Einsatz. Als Werkzeuge zum Bearbeiten und Analysieren von DNA-, RNA- und Proteinsequenzen wurden DNA-Strider 1.2, das DNASTar-Programm und GCG benutzt. Graphiken wurden mit Canvas und Adobe Photoshop erstellt und bearbeitet. Auf folgende Internetressourcen wurde zurückgegriffen:

<http://www.ebi.ac.uk> .....Sequenzvergleiche, Zugriff auf EMBL-, GenBank-, Swissprot Datenbanken

<http://transfac.gbf.de> .....Zugriff auf TransFac-Datenbank und MatInspector® Programm

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ein Standard-PCR Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 18,75 µl H<sub>2</sub>O, 0,75 µl 50mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 1 µl 10 µM Hinprimer, 1 µl 10 µM Rückprimer, 0,5 µg Template-DNA und 0,25 µl Taq-Polymerase von InViTek 1 U/µl. Die Annealing-Temperaturen wurden unter Verwendung der Formel  $T_m = 69,3\text{ °C} + 0,41 \times (\text{GC}\%) - 650/\text{Primerlänge} + 3\text{ °C}$  abgeschätzt. Die weiteren PCR Bedingungen wurden angelehnt an das Protokoll von Kramer und Coen (**Kramer und Coen 1995**).

### 3.2.2 Radioaktiv markierte Sonden

#### “random primed DNA labeling”

100 ng gereinigte PCR-Fragmente (Protokoll von QIAGEN) wurden mit 5 µl [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP (3000-6000 Ci/mMol) und 2 µl Hexanukleotid-Primer-Mix nach dem Protokoll von Boehringer Mannheim radioaktiv markiert, von restlichen radioaktiven Nukleotiden mit Affinitätssäulen nach dem Protokoll von QIAGEN befreit und nach 5 min Kochen zur Hybridisierungslösung gegeben.

### **Radioaktiv markierte Transkripte**

1 µg linearisierte Plasmid-DNA wurde unter Verwendung von 2,5µl [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-UTP (800 Ci/mmol) und T3 oder T7 Polymerase nach dem Protokoll von Promega (Promega Riboprobe® in vitro system) generiert. Die Entfernung überschüssiger Nukleotide erfolgte durch Fällung der RNA-Sonde mit 2,5Vol Äthanol und 1/10Vol. 3M NaAc für 30 min. bei -80°C und 2 maliger Waschung mit -20°C kaltem 70%igem Äthanol. Nach Aufnahme in 100µl 1xTE-Puffer wurde die Sonde der Hybridisierungslösung zugegeben.

### **3.2.3 Southernblots**

40 µg Kaninchen-DNA aus der Leber wurden 8 h mit Restriktionsenzymen gespalten. Die Reaktionen wurden mit dem vom Enzymhersteller empfohlenen Puffersystem und 3 U Enzym/µg DNA in einem Endvolumen von 400 µl durchgeführt. Die Anreicherung der DNA geschah nach Phenol/Chloroformextraktion und Fällung in 70% Äthanol bei -80 °C in 20 µl 1xTE. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 1% Agarosegel über Nacht. Nach Photographie des Gels erfolgte dessen Übertragung auf eine Nylonmembran mittels Kapillartransfer in 20xSSC. Die Kreuzvernetzung der DNA mit dem Filter wurde bei 80°C für 2h im Heißluftofen durchgeführt (Southern 1975).

### **3.2.4 Hybridisierungen mit DNA und RNA Sonden**

Die Prähybridisierung des Blots erfolgte 2h bei 68°C im Hybridisierungssofen. Die Hybridisierung wurde über Nacht in Hybridisierungslösung ebenfalls bei 68°C durchgeführt. Der Blot wurde anschließend mehrmals (4-6 mal) in Waschpuffern mit absteigender Salzkonzentration (2x SSC/0,1%SDS, 1x SSC/0,1% SDS, 0,5x SSC/0,1% SDS, 0,1x SSC/0,1% SDS) von unspezifisch gebundener Radioaktivität befreit. Die Temperaturen (45°C - 65°C) und Waschzeiten (1h-8h) richteten sich nach der detektierbaren Hintergrundaktivität (Maniatis et al. 1989). Die Exposition erfolgte mit Röntgenfilmen bei -80°C für 1h -2d je nach Signalstärke.

### 3.2.5 Sequenzierungen

Die Sequenzierungen erfolgten per Auftrag durch die Firma InViTek Berlin nach der Methode von Sanger (Dideoxy-Methode) mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden auf dem ABM Prism Sequencer Model 2.1.1., oder selbst von Hand mit  $^{35}\text{S}$  markiertem dATP und dem Sequenzierungskit der Firma USB (Maniatis et al. 1989).

### 3.2.6 Screening einer genomischen Lambda DASH® Phagenbank

Das Screening der genomischen Kaninchenphagenbank Lambda DASH® II orientierte sich am Firmenprotokoll von Stratagene. Die Plaquedichte wurde so gewählt, daß auf 16 Platten ( $\varnothing$  13 cm) mit je etwa 30 000 pfu das Kaninchengenom statistisch 2-3 mal vertreten war. Nach partieller Spaltung der DNA mit *Sau3AI* erfolgte der Einbau von 9-22 kb großen Fragmenten in den Lambda DASH® II Phagenvektor. Als Sonde fand ein markiertes PCR Fragment Verwendung, das ein Teilamplifikat aus dem kodierenden Teil des TCTP-cDNA-Klones 31/1 darstellte (Primer LX2H4/LX2R1). Nach Primär-, Sekundär- und Tertiärscreening gelang die Isolierung von 13 Pseudogenklonen ( $\lambda$ 1- $\lambda$ 13) und einem *TPT1*-Gen-Klon ( $\lambda$ H1). Die Präparation von  $\lambda$ -DNA wurde Maniatis et al. 1989 entnommen. Durch erneutes Screening der Bank mit Hilfe einer radioaktiv markierten Intronsonde wurden zwei weitere genomische *TPT1*-Klone gewonnen ( $\lambda$ H2,  $\lambda$ H3), wobei geeignete Restriktionsfragmente des Klon  $\lambda$ H2 weiter subkloniert und analysiert wurden.

### 3.2.7 Screening einer P1-Bank nach genomischen Human-TPT1-Klonen

Die Vorgehensweise der Klonsuche ist dem Kap. 4.3.5 zu entnehmen. Die weitere Subklonierung von Restriktionsfragmenten des P1 Klones 231/E12 wurde wie folgt gestaltet.

**Klon 18:** Der Klon E12 wurde *XbaI/NotI* gespalten und das Gemisch aller Fragmente in einen *XbaI/NotI* linearisierten pBLSK+ Vektor ligiert. Mit einem radioaktiv markierten PCR-Fragment aus Klon E12 (Primer: P23-37H/HMO-TAP-R2) wurden per Koloniehybridisierung positive Bakterienklone selektiert. Die Analyse des Inserts von Klon 18 ergab eine Größe von 6,6 kb. Der *NotI* Ort lag im Intron 1 während sich der *XbaI* Ort stromaufwärts des Gens befand. **Klon 18/BgIII/XbaI:** Klon 18 wurde mit *BgIII/XbaI* geschnitten und unter Deletion eines 6,1 kb Fragmentes religiert. Dieser Klon enthält 501 bp des humanen *TPT1*-Promotors.

### 3.2.8 Subklonierung genomischer Fragmente

**$\lambda$ H2-*Eco*RI:** Der das Kaninchen-*TPT1*-Gen enthaltene  $\lambda$ -Klon  $\lambda$ H2 wurde mit *Eco*RI gespalten und das durch Southernblots identifizierte 6,8 kb Fragment aus dem Gel eluiert. Dieses wurde in einen *Eco*RI geschnittenen und Phosphatase behandelten pBLSK + Vektor ligiert. **H7:** Der Klon  $\lambda$ H2-*Eco*RI wurde mit *Nhe*I gespalten und das 0,9 kb große *Nhe*I/*Nhe*I Fragment aus dem Gel eluiert. Dieses Fragment wurde in einen *Xba*I geschnittenen und Phosphatase behandelten pBLCAT3 Vektor ligiert. Die Orientierung des Fragmentes wurde durch *Hind*III-Spaltung überprüft. **H12:** Der Klon  $\lambda$ H2-*Eco*RI wurde mit *Nhe*I und *Hind*III gespalten und das 460 bp große Fragment aus dem Gel eluiert. Dieses wurde in einen *Hind*III/*Xba*I geschnittenen pBLCAT3 Vektor ligiert. **H33:** Der Klon H12 wurde mit *Eco*NI und *Hind*III gespalten, das 4 kb große pBLCAT3 Vektorfragment isoliert, die Enden mit der Klenow-Polymerase aufgefüllt und anschließend religiert. **H27/H31:** Das einklonierte Fragment des Klones H12 wurde mit Hilfe flankierender Primer (CAT3H2/CAT3R2) unter Einschluß von Teilen des Polylinkers per PCR in quantitativen Mengen amplifiziert, isoliert und anschließend mit *Rsa*I bzw. *Msp*AI nachgespalten. Diese Fragmente wurden in den *Hind*III gespaltenen, mit Hilfe von Klenow-Polymerase glattendig gemachten und anschließend *Bam*HI gespaltenen pBLCAT3 Vektor einkloniert (H27=*Bsp*MI, H31=*Rsa*I). ***TPT1*-ps1/2/3/4:** Southernblots mit *Eco*RI gespaltenen DNA der Klone  $\lambda$ 1- $\lambda$ 13 wurden mit einer TCTP-kodierenden Sonde hybridisiert und autoradiographisch dargestellt. Die in Abb. 4-21 markierten Banden wurden aus Agarosegelen extrahiert, in den mit *Eco*RI linearisierten und Phosphatase behandelten Vektor pBLSK+ ligiert und die *TPT1*-Pseudogen enthaltenen Bereiche anschließend sequenziert. **H21, H14, H25:**  $\lambda$ 1 (*TPT1*-ps3),  $\lambda$ 7 (*TPT1*-ps1) und  $\lambda$ 9 (*TPT1*-ps2) DNA wurde mit *Nhe*I und *Xba*I gespalten und die 700, 800 und 2000 bp großen Banden in einen *Xba*I linearisierten und Phosphatase behandelten pBLSK+ Vektor ligiert. Die positiven Klone wurden durch Spaltung mit *Bam*HI auf die richtige Orientierung überprüft. **H35:** Das 1,2 kb große *Hind*III/*Nhe*I Fragment aus dem Klon  $\lambda$ 12 (*TPT1*-ps4) wurde in *Hind*III/*Nhe*I linearisierten pBLSK+ ligiert.

Klon	Insert Größe	Insert Orient.	Insert enthält ...	Vektor
λH2	15 kb	?	Kan. <i>TPT1</i> -Gen komplett	λ-DASHII
λH2- <i>EcoRI</i>	7 kb	-	Kan. <i>TPT1</i> -Gen komplett	pBLSK +
λH2- <i>SmaI</i>	4 kb	+	Kan. <i>TPT1</i> -Gen ab Intron 1	pBLSK +
H7	0,9 kb	+	Kan. <i>TPT1</i> -Promotor	pBLCAT3
H12	0,49	+	Kan. <i>TPT1</i> -Promotor	pBLCAT3
H33	0,37	+	Kan. <i>TPT1</i> -Promotor	pBLCAT3
H27	0,25	+	Kan. <i>TPT1</i> -Promotor	pBLCAT3
H31	0,15	+	Kan. <i>TPT1</i> -Promotor	pBLCAT3
231/E12	100 kb	?	Human <i>TPT1</i> -Gen komplett	P1
Klon18	6,6 kb	?	Human <i>TPT1</i> -Gen bis Intron1	pBLSK+
Klon18/ <i>BglII/XbaI</i>	0,5 kb	?	Human <i>TPT1</i> -Gen bis Intron1	pBLSK+
H14	0,8	+	<i>TPT1</i> -ps1-Promotor	pBLCAT3
H25	2,0	+	<i>TPT1</i> -ps2-Promotor	pBLCAT3
H21	0,7	+	<i>TPT1</i> -ps3-Promotor	pBLCAT3
H35	1,2 kb	+	<i>TPT1</i> -ps4-Promotor	pBLCAT3
λ1-λ13	15 kb	?	<i>TPT1</i> -Pseudogene	λ-DASHII
λ2- <i>EcoRI</i> λ7- <i>EcoRI</i> λ13- <i>EcoRI</i>	1,8 kb	?	<i>TPT1</i> -ps1	pBLSK+
λ9- <i>EcoRI</i>	2,5 kb	?	<i>TPT1</i> -ps2	pBLSK+
λ1- <i>EcoRI</i>	2,5 kb	?	<i>TPT1</i> -ps3	pBLSK+
λ12- <i>EcoRI</i>	3,0 kb	?	<i>TPT1</i> -ps4	pBLSK+
H40	0,39 kb	-	Kaninchen kodierend aus TCTP-mRNA	pCRScript SK+
hP23/3'UTR2	0,69 kb	+	Human, komplette TCTP-3'UTR2	pCRScript SK+

**Tabelle 2** Kurzübersicht verwendeter Vektoren und Klone, sowie Größen, Orientierungen und Inhalte der Inserts.

### 3.2.9 CAT-Assays

Glatte Aorta-Muskelzellen vom Kaninchen (**S. Ylä-Herttuala, Kuopio, Finnland**) wurden in DMEM unter Zusatz von 10% FKS, 50 µg/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert. 5 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden pro Ansatz mit 30 µg CAT-Konstrukt-Plasmid und 8 µg beta-Gal-Plasmid nach der Elektroporationsmethode kotransfiziert (**Bergot et al. 1992**). Die Bestimmung der CAT Enzymaktivität wurde entsprechend der Vorschrift von Gorman et al. (**Gorman et al. 1982**) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach 48h in Zellkultur abzentrifugiert, ein Proteinextrakt präpariert und die Proteinkonzentration nach einer modifizierten Biuret-Methode (Micro BCA Protein Assay Kit, Pierce, USA) bestimmt. Aus 90 µg Proteinextrakt wurden die <sup>14</sup>C-markierten acetylierten Chloramphenicol-Produkte angereichert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Nach Exposition der Kieselgelplatten gegen einen Röntgenfilm wurden die Acetylierungsprodukte auf den Platten markiert, ausgeschnitten und die Stärke der Aktivität im Szintillationszähler quantifiziert. Zur Kalibrierung der Unterschiede in der Transfektionseffizienz wurde die gemessene Aktivität durch Bestimmung der

$\beta$ -Galaktosidaseaktivität aller Ansätze umgerechnet. Alle Experimente wurden zur statistischen Sicherung 3-4 mal wiederholt (**Maniatis et al. 1989, Kramer und Coen 1995**).

### **3.2.10 Dotblots**

Aus einer humanen Monozyten-cDNA-Bank wurden per PCR ein 388 bp großes kodierendes Fragment (Primerkombination P23-H8/HMO-TAP-R1) und ein 690 bp großes Fragment aus der humanen 3'UTR2 der TCTP-cDNA (Primerkombination hP23-U2H/hP23-U2R) amplifiziert und mit dem pCR-Script™ Amp.SK+ Kloniersystem von Stratagene subkloniert. Nach Verifizierung der PCR-Produkte durch Sequenzierung und enzymatischer Linearisierung der Vektoren wurden mit dem Promega Riboprobe® in vitro System radioaktiv markierte Transkripte generiert. Mit diesen Sonden wurde ein kommerziell erhältlicher RNA-Dotblot mit Poly(A)+RNA aus 50 verschiedenen menschlichen Geweben (Human Master Blot, Clontech) nacheinander im Abstand von 3 Monaten nach Abklingen der Aktivität hybridisiert. Nach der Anfertigung autoradiographischer Aufnahmen (die Expositionszeit für den mit der kodierenden Sonde hybridisierten Blot betrug 4 h und für die 3'UTR2-spezifische Sonde 2 Tage) wurden mit zwei verschiedenen Phosphorimagersystemen von Biorad (Modell GS-525 und Modell FX) die Signale jeweils quantitativ ausgewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Strukturen der TCTP-mRNAs

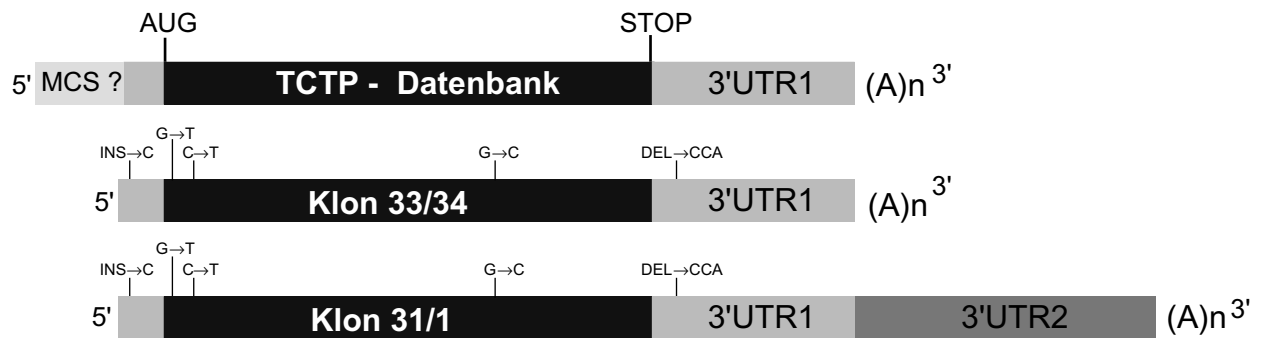
#### 4.1.1 TCTP-mRNA-Varianten mit alternativen 3'UTRs

Die Aktivität eines Gens spiegelt sich in seinen Transkripten wider. Da sich diese Arbeit in erster Linie mit der Transkriptionskontrolle des *TPT1*-Gens des Kaninchens beschäftigen sollte, war es sinnvoll, die Transkripte dieses Gens genauer zu untersuchen. Aus Datenbankeinträgen gingen die TCTP-mRNA-Sequenzen von Maus, Mensch und Kaninchen hervor. Die Sequenz der Maus war als einzige vollständig und enthielt am 5'-Ende der 5'-UTR eine als "Polypyrimidin-Trakt" bezeichnete Struktur, die ursächlich für die posttranskriptionelle Kontrolle angesehen wird. Die Humansequenz und die des Kaninchens waren 5'UTR-seitig nur unvollständig aufgeklärt. Eine Konservierung der für diesen mRNA Typ charakteristischen Polypyrimidinsequenzen auch bei anderen Säuger TCTP-mRNAs wäre als Hinweis für ihre allgemeine Bedeutung bei der posttranskriptionellen Regulation der Synthese des TCTP zu deuten gewesen. Deshalb war die vollständige Aufklärung der 5'UTR eine weitere, im Vordergrund stehende Aufgabe.

Für die Analyse von Transkripten gibt es mehrere Möglichkeiten. Northernblots geben Aufschluß über die Vielfalt vorhandener Transkripte, ihre Größen und Mengen und gestatten Aussagen über gewebsspezifische Unterschiede (Kap. 4.1.2.). Auch cDNA-Banken spiegeln die Genaktivität der Gewebe wider, aus denen sie erstellt worden sind und gestatten neben semiquantitativen Aussagen auch eine direkte Sequenzierung der positiven Klone.

Die Suche nach TCTP-positiven Rekombinanten in einer Kaninchen Retikulozyten cDNA Bank mit einer Kaninchen TCTP-cDNA Sonde erbrachte mehrere Klone, die sich auf zwei Varianten reduzieren ließen (**M. Berger, Promotion 1998**). Als Sonde wurde ein PCR-Fragment benutzt, das den größten kodierenden Teil der mRNA repräsentierte. Die Primer (LX2H4b/LX2R1) wurden aus der Datenbanksequenz Z46805 abgeleitet. Die Inserts positiver Klone wurden durch Spaltung mit Restriktionsenzymen und PCR charakterisiert und einige Klone mit möglichst langen Inserts vollständig sequenziert. Die Abb. 4-1 zeigt schematisch den Aufbau der gefundenen TCTP-cDNA Klone im Vergleich mit der Datenbanksequenz (EMBL-Zugangsnummer Z46805).





**Abb. 4-1 Vergleich der publizierten TCTP-cDNA Sequenz mit Klonen aus einer cDNA-Bank:** Hauptunterschied ist die verlängerte 3'UTR2 des Klonen 31/1. Ursache der Punktmutationen in den Klonen 33/34 und 31/1 sind wahrscheinlich Sequenzierfehler der veröffentlichten Datenbanksequenz, die 5'UTR-seitig zudem noch Teile des zur Klonierung benutzten Vektors enthält (MCS).

Am auffälligsten präsentierte sich der Klon 31/1, der sich von den anderen durch eine 320 bp längere 3' UTR unterschied (3'UTR2). In keiner bislang untersuchten Spezies konnte zu diesem Zeitpunkt ein Gegenstück zu dieser Sequenz gefunden werden. Da auch die Gensequenz fehlte, konnten hinsichtlich des Entstehungsmechanismus nur verschiedene Hypothesen herangezogen werden. Generell wäre es möglich, durch alternatives Splicing des letzten Exons zu alternativen Transkripten zu gelangen. Eine andere Erklärung ergäbe sich durch die Existenz mehrerer Gene im Sinne einer Multigenfamilie. Die häufigste Ursache bei der Bildung von Transkripten, die sich in der Länge der 3'UTR unterscheiden, stellt jedoch die Benutzung alternativer Polyadenylierungssignale dar. In der Tat konnte ein zweites Polyadenylierungssignal (AATAAA) in der Position 1141 gefunden werden.

Belegt werden konnte dies durch die Aufklärung der Kaninchengensequenz (Kap.4.2) und durch die 1996 bekanntgewordene Teilsequenz des humanen *TPT1*-Gens (**Bonaldo et al. 1996**). Das humane *TPT1*-Gen ist dem Kaninchengen stark homolog. Insbesondere die verlängerte 3'UTR2 Sequenz findet sich wieder. In Human-Northernblots finden sich ebenso wie im Kaninchenblot zwei Signale, und der humane "expressed sequence tag" (EST) HUM000S635 ist mit der humanen 3'UTR2 Sequenz identisch. EST-Datenbanken bestehen aus 3'UTR und 5'UTR-seitig angeordneten cDNA-Bibliotheken verschiedener Gewebe. Damit ist der cDNA Klon HUM000S635 das humane Äquivalent zum Kaninchenklon 31/1. Der Vergleich der Klone 33/34 und 31/1 mit der cDNA Sequenz aus der Datenbank (Z46805) zeigte insgesamt fünf Nukleotidunterschiede, darunter drei Punktmutationen in der kodierenden Sequenz, die auch nicht-konservative Aminosäureaustausche (Pos. 4: Aspartat → Tyrosin, Pos. 13: Methionin →

Threonin, Pos. 129: Phenylalanin → Leucin), eine Insertion in der 5' UTR (Pos. 76: Ins. → Cytosin) und eine 3 bp Deletion in der 3' UTR (Pos. 705: Del. → CCA). Da sich alle diese Abweichungen in der Basensequenz sowohl im Gen, als auch in den Pseudogenen bestätigten, dürfte es sich hierbei um Sequenzierfehler in der veröffentlichten Sequenz handeln. Die Möglichkeit, daß die Mutationen auf rassebedingte Polymorphismen zurückzuführen sind, ist jedoch auch nicht auszuschließen. Die folgende Sequenz (Abb. 4-2) zeigt die lange TCTP-cDNA2 (3'UTR1 + 3'UTR2). Die 3'UTR2 Sequenz beginnt ab Position 844. Die Rekonstruktion der kompletten 5'UTR war durch die spätere Analyse des *TPT1*-Gens und der *TPT1*-Pseudogene möglich. Sie zeigt alle Merkmale der schon von der Mausequenz bekannten Polypyrimidinstruktur.

1	CTTTTCGCCGCTCCCCCTACCCCGAGGGCGCTCCGGCTGCACCGCTCGCTCTGAGCTCCGGGCTCCTGCCAAGC	80
81	TAGCGCCGCCGCTGTCGTCTCTACCAGCCGCCATC	ATG ATT ATC TAC CGG GAC CTC ATC AGC CAC GAT 149
1		M I I Y R D L I S H D 11
150	GAG ATG TTC TCC GAC ATC TAC AAG ATC CGG GAG ATC GCG GGC GGA CTG TGC CTG GAG GTG	209
12	E M F S D I Y K I R E I A G G L C L E V	31
210	GAG GGG AAG ATG GTC AGT AGG ACA GAG GGT AAC ATT GAT GAT TCG CTC ATC GGT GGG AAT	269
32	E G K M V S R T E G N I D D S L I G G N	51
270	GCC TCC GCC GAA GGG CCG GAG GGC GAA GGT ACC GAA AGC ACA GTG ATC ACT GGT GTT GAT	329
52	A S A E G P E G E G T E S T V I T G V D	71
330	ATT GTC ATG AAC CAT CAC CTG CAG GAA ACC AGC TTC ACA AAA GAA GCC TAC AAG AAG TAC	389
72	I V M N H H L Q E T S F T K E A Y K K Y	91
390	ATC AAA GAT TAC ATG AAA TCA ATC AAA GGC AAA CTT GAA GAA CAG AGA CCA GAG AGA GTA	449
92	I K D Y M K S I K G K L E E Q R P E R V	111
450	AAA CCT TTT ATG ACA GGG GCT GCA GAA CAA ATC AAG CAC ATC CTT GCT AAT TTC AAA AAC	509
112	K P F M T G A A E Q I K H I L A N F K N	131
510	TAC CAG TTC TAT ATT GGT GAA AAC ATG AAT CCA GAT GGC ATG GTT GCT CTG CTG GAC TAC	569
132	Y Q F Y I G E N M N P D G M V A L L D Y	151
570	CGT GAG GAT GGT GTG ACC CCG TTT ATG ATT TTC TTT AAG GAT GGT TTA GAG ATG GAA AAA	629
152	R E D G V T P F M I F F K D G L E M E K	171
630	TGT TAA CAAAGTTGGCAATTTGGATCTATCACTGCTCATCGTAAGCTGGCTGCTGCTTGTCATCCACACAACACCAGGA	707
72	C *	173
708	TTTACAGGAAGTGGGACTGATGTTATGTTGAGCTCCTCACTTATTTTGACCATGATTTACTTCAAGTGAGGCATTGTTT	787
788	TTAAGGCAAAAAACATTGTCATGTAGGTTGTCTAAAAATAAAATGCATTAAATT	867
		↑ Beginn der 3'UTR2
868	AATGTACATTTAAGCTAAATCCATCCTGTAGTGTTCCTGGAGAAGCTAAAGCCTGGTTGTAGACACTACTAGAAAGCA	947
948	TAAGACTGTCTTCAGATAACTTCTACAGTGAAAAGTCTGGGACTGGAATATAAACTGAGAATCCAAAGTTAAATTCTGA	1027
1028	ATTACAGTAAAGGGAAAAACCATGCTCATAGCAGTGCCAAACATTGAAGTGAGCCTTAACACATTTTCATCACCTACAAC	1107
1108	GGAAGTAGCTAACTGGAAGAGATTACCAAAAGATAAAGAGAGACTGATTGAGTTG	1163

**Abb. 4-2 Vollständige TCTP-cDNA2 Sequenz des Kaninchens:** Die beiden alternativ benutzten Polyadenylierungssignale und der Beginn der 3'UTR2 sind unterstrichen dargestellt. Die Sequenz der TCTP-cDNA2 und die daraus hervorgehende TCTP-cDNA1-Sequenz sind unter AJ131951 in der EMBL-Datenbank abgelegt (\*=STOP-Signal).

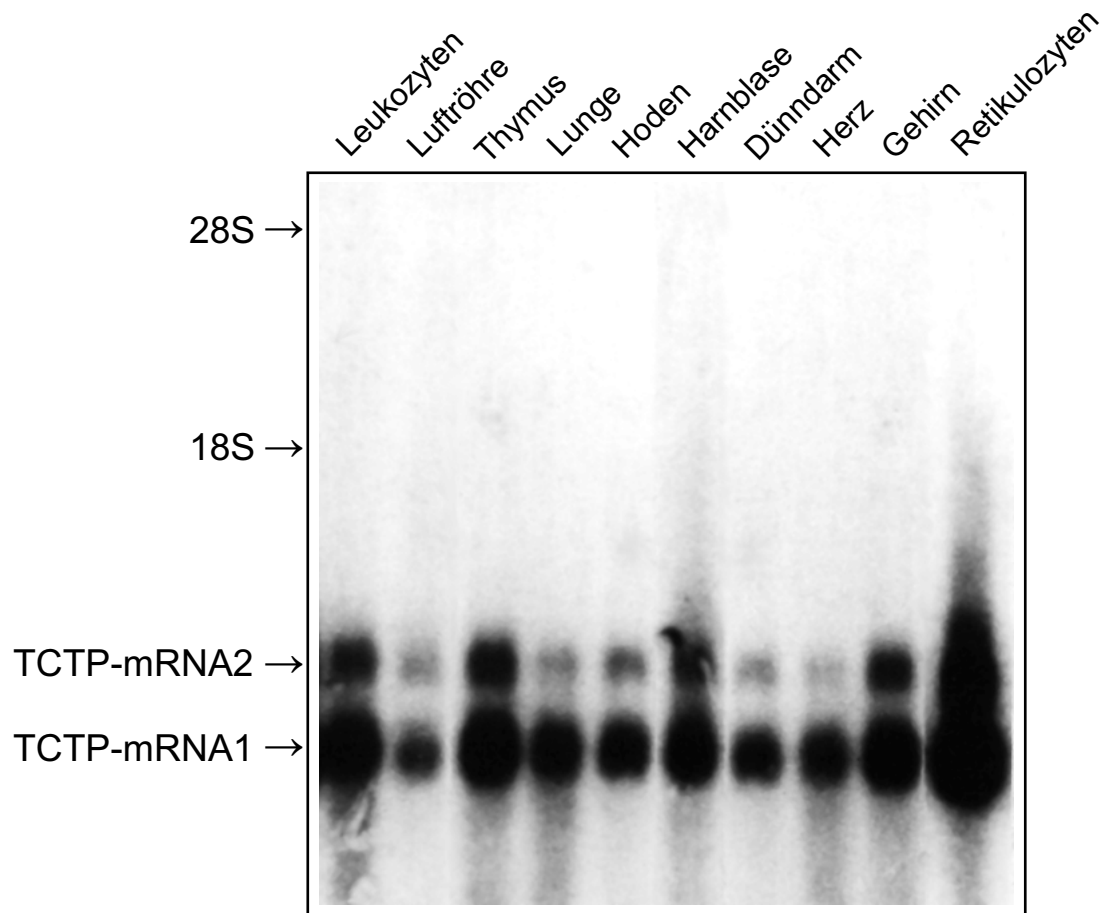
#### **4.1.2 Unterschiede in der gewebsspezifischen Transkription der TCTP-mRNAs bei Mensch und Kaninchen**

Die Frage nach der quantitativen Verteilung der beiden gefundenen TCTP-mRNAs in verschiedenen Geweben war aus mehreren Gründen interessant. Zum einen erhofften wir uns prinzipielle Aussagen über die Frage, in wieweit TCTP gewebsspezifisch transkribiert wird. Damit sollte eine Lücke in der Literatur geschlossen werden, denn bislang gab es keine Untersuchung dieser Art. Zum anderen wollten wir prüfen, ob die alternativen Transkripte funktionell mit spezifischen Geweben in Verbindung zu bringen waren.

Der Mechanismus, durch den die beiden TCTP-mRNAs entstehen, wurde schon im Kap. 4.1.1 angedeutet. Bestätigt wurde dies durch die spätere Aufklärung der Gensequenz (Kap. 4.2). Das Gen besitzt innerhalb der 3'UTR zwei unterschiedliche Polyadenylierungssignale. Offensichtlich ist die Poly(A)-Polymerase in allen untersuchten Geweben in der Lage, bei primären TCTP-Transkripten beide Signale zu erkennen. Daß dies nicht immer so ist, zeigt das Beispiel der 15-Lipoxygenase beim Kaninchen, wo alternative Polyadenylierung hochgradig gewebsspezifisch erfolgt (**Thiele et al. 1999**).

Hinsichtlich der gewebeabhängigen Transkriptionsmuster kann man drei Typen unterscheiden. Viele Genprodukte werden von allen Zelltypen gleichermaßen benötigt, etwa Strukturproteine wie Actin, Tubulin oder Enzyme des zentralen Energiestoffwechsels. Solche Gene werden als Haushaltsgene bezeichnet. Man findet typischerweise in allen Geweben vergleichbare Mengen an mRNA. Eine andere Gruppe von Genen wird auch in allen Geweben transkribiert, jedoch findet man hier quantitative Unterschiede. Die dritte Gruppe von Genen wird spezifisch in wenigen Geweben transkribiert. Hämoglobin in roten Blutzellen oder Immunglobuline in Plasmazellen sind hierfür Beispiele. Zu klären war die Frage, in welche Gruppe sich das *TPT1*-Gen einordnen ließ.

Eine bewährte Methode zur Darstellung von mRNAs in Geweben sind Northernblots. Deren Auswertung gestattet quantitative und qualitative Aussagen zur Transkription der untersuchten mRNA. Derartige Versuche mit TCTP-spezifischen Sonden aus dem kodierenden Teil der cDNA-Sequenz wurden mit einer Auswahl verschiedener Gewebe des Kaninchens durchgeführt (**Berger, nichtpublizierte Ergebnisse**).



**Abb. 4-3 Northernblot von Kaninchen-mRNA aus verschiedenen Geweben:** Als Sonde wurde eine kodierende Sonde aus der TCTP-cDNA1 verwendet. Neben den als Marker fungierenden 18S und 28S rRNAs sind die Positionen des kurzen TCTP-Messengers (843 nt) und des langen Messengers (1163 nt) markiert. (Mit freundlicher Genehmigung von M. Berger)

Man erkennt zwei Signale bei 0,8 kb und 1,2 kb. Diese entsprechen den beiden alternativen TCTP-Transkripten. Das Mengenverhältnis der kurzen mRNA1 zu der langen mRNA2 schwankte in den Geweben schätzungsweise 4:1 bis 10:1. Festzuhalten war, daß in allen untersuchten Geweben eine Transkription stattfand und sich in allen Geweben der kurze mRNA1-Messenger als dominierend erwies. Die Aussagekraft des Northernblots war in sofern eingeschränkt, daß zwar gleiche Mengen Gesamt-RNA aufgetragen worden waren, aber keine Kalibrierung mit Sonden von Haushaltsgenen erfolgte und somit der Gewebsvergleich untereinander limitiert war. Ferner konnte nur eine kleine Auswahl von Geweben berücksichtigt werden.

Der Entschluß, weitergehende Untersuchungen anzustellen, war neben diesen Gründen auch eine Arbeit, die zeigen konnte, daß TCTP in humanen Nierenzellen und Nierenkarzinomzellen nicht

exprimiert wurde (Sanchez et al. 1997a). Um möglichst viele Gewebe zu erfassen und eine höchstmögliche Genauigkeit in der quantitativen Aussage zu erreichen, wurden an Stelle von Northernblots RNA-Multigewebe („multitissue“) Dotblots verwendet. Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit dem überwiegend aus humanen Quellen stammenden publizierten Material verwendeten wir ebenfalls ein Humansystem. Man kann jedoch davon ausgehen, daß Mensch und Kaninchen keine wesentlichen Unterschiede im TCTP-Expressionsmuster zeigen sollten. Diese Aussage läßt sich aus der großen Ähnlichkeit beider *TPT1*-Gene und ihrer Transkripte ableiten. Als Sonden für die Blots kamen radioaktiv markierte  $^{32}\text{P}$ -Transkripte zum Einsatz, die von verschiedenen Teilen der humanen TCTP-cDNA stammten. Abb. 4-4 verbildlicht die Lage der Sonden zur TCTP-mRNA. Mit der kodierenden Sonde wurden beide mRNAs summarisch erfaßt, während die 3'UTR2 Sonde spezifisch für den langen Messenger war.

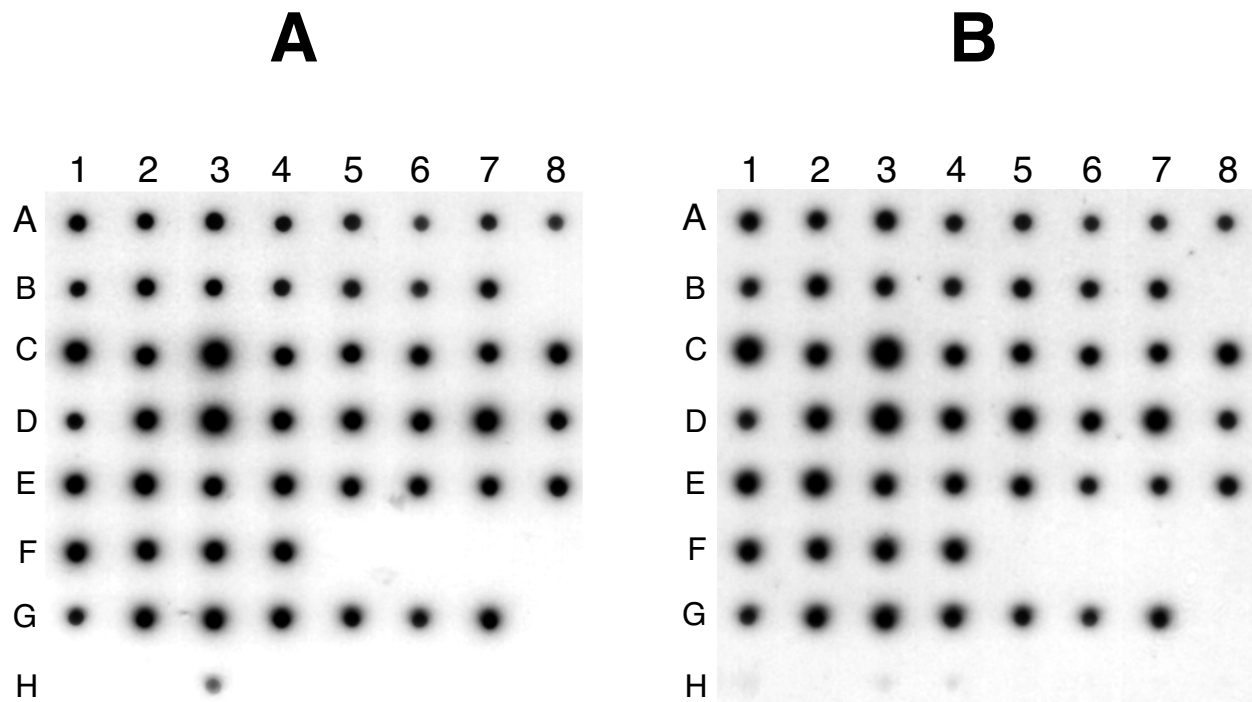


**Abb. 4-4 Die zur Dotplot-Hybridisierung benutzten Sonden in Relation zu ihrer Lage innerhalb der humanen TCTP-cDNA2.**

Tabelle 3 zeigt den Aufbau des Blots mit den Positionen der mRNAs der verschiedenen Gewebe. Die Ergebnisse der Hybridisierung des Blots mit den zwei verschiedenen Sonden nach Anfertigung autoradiographischer Aufnahmen sind in Abb. 4-5 gegenübergestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Gehirn	Mandelkern	Schweifkern	Kleinhirn	Hirnrinde	Frontalhirn	Hippocampus	Hirnstamm
B	Occipitalhirn	Putamen	schwarze Substanz	Scheitelhirn	Thalamus	Luys-Körper	Rückenmark	
C	Herz	Aorta	Skelettmuskel	Dickdarm	Blase	Uterus	Prostata	Magen
D	Hoden	Ovarien	Pancreas	Hypophyse	Nebenniere	Schilddrüse	Speicheldrüse	Brustdrüse
E	Niere	Leber	Dünndarm	Milz	Thymus	Leukozyten	Lymphknoten	Knochenmark
F	Blinddarm	Lunge	Luftröhre	Placenta				
G	fetales Gehirn	fetales Herz	fetale Niere	fetale Leber	fetale Milz	fetaler Thymus	fetale Lunge	
H	Hefe RNA 50ng	Hefe tRNA 100ng	E.coli rRNA 100ng	E.coli DNA 100ng	Polyr(A) 100ng	human cöt1DNA 100ng	human DNA 100ng	human DNA 50ng

**Tabelle 3 Aufbau des Multigewebedotblots:** mRNA von 50 adulten (Reihe A-F) und fetalen (Reihe G) Geweben des Menschen wurden als Dotplot auf eine Membran aufgetragen. Alle Gewebe wurden durch Hybridisierung mit verschiedenen Haushaltsgensonden so quantitativ kalibriert, daß deren Signalstärke in allen Geweben gleich ist. Reihe H enthält verschiedene Negativkontrollen und erlaubt Aussagen über mögliche Kreuzhybridisierungen.



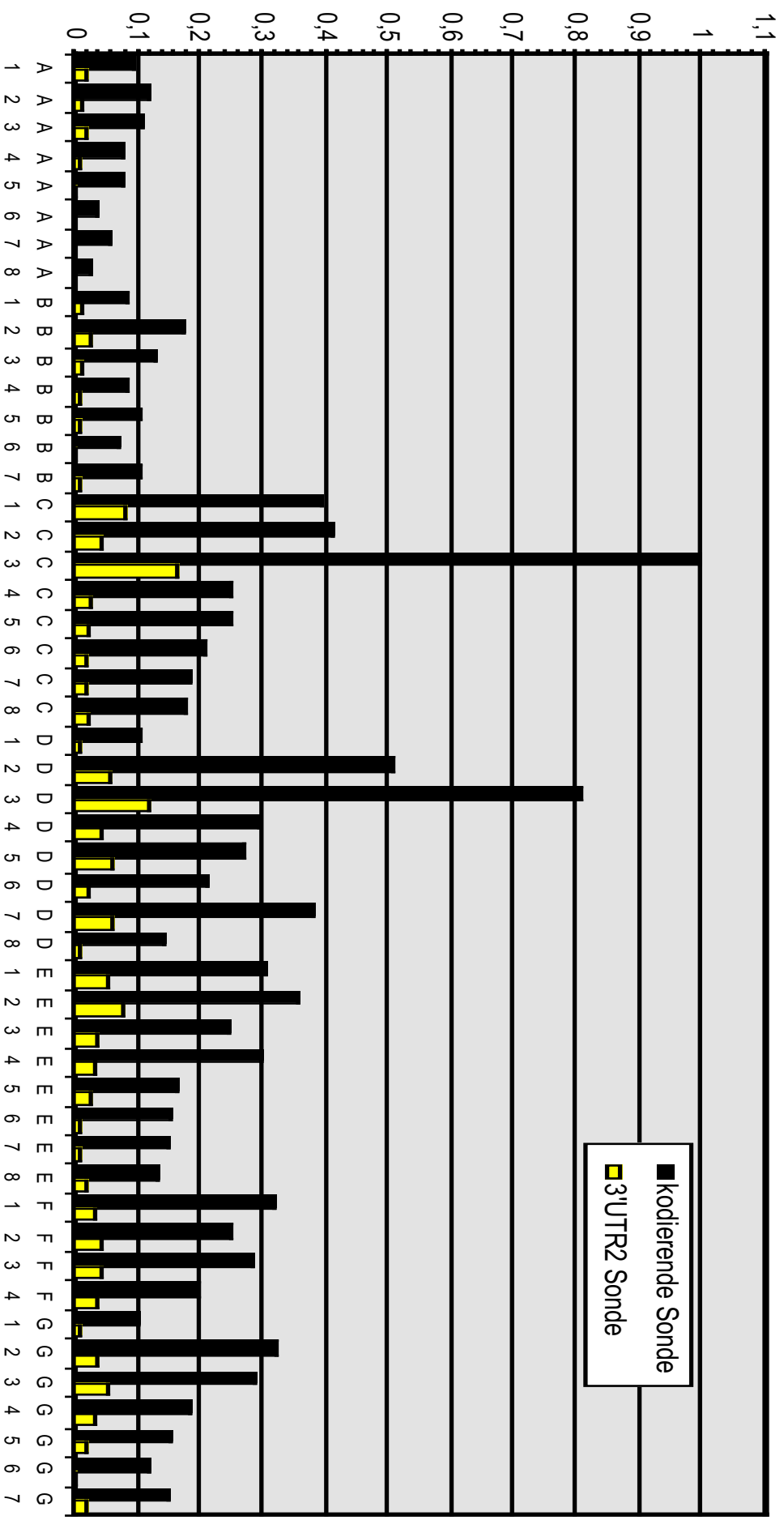
**Abb. 4-5 Humaner Multigewebedotplot nach Hybridisierung mit verschiedenen Sonden:** Abbildung **A** zeigt den Blot nach Hybridisierung mit der kodierenden TCTP-Sonde und 4 h Expositionsdauer, Abbildung **B** nach Hybridisierung mit der 3'UTR2 Sonde und 2 d Exposition.

Wie man in Abb. 4-5 erkennen kann, findet in allen untersuchten 50 adulten und fetalen Geweben eine Transkription statt. Die Stärke der Signale ist in Geweben wie Gehirn und Hoden deutlich schwächer als in muskelreichen Geweben, wie glatten Muskelzellen, die das stärkste Signal aller Gewebe haben. Ein fast identisches Muster findet sich zwischen den mit der kodierenden Sonde einerseits und der 3'UTR2-spezifischen Sonde andererseits hybridisierten Blots.

Um die Ergebnisse besser quantifizierbar zu machen, (Abb. 4-5 zeigt Blots, die unterschiedlich lange exponiert wurden) wurden die Blots mit Hilfe eines Phosphorimagersystems digital gescannt. Die Hybridisierungsmuster beider Sonden wurden mit zwei unterschiedlichen Phosphorimager untersucht und zwischen den Datensätzen der Mittelwert gebildet. Ein gewisses Problem ergibt sich aus der Tatsache, daß die Datensätze der beiden Sonden nicht unmittelbar miteinander vergleichbar sind. Diese Information erschließt sich jedoch aus dem Northernblot der Abb. 4-3. Die beiden Signale des kurzen und langen TCTP-Messengers lassen sich hier ihren Signalstärken entsprechend miteinander ins Verhältnis setzen. Dieses Verhältnis wurde ungefähr auf 4:1 - 10:1 der kurzen TCTP-mRNA1 zur langen TCTP-mRNA2 geschätzt.

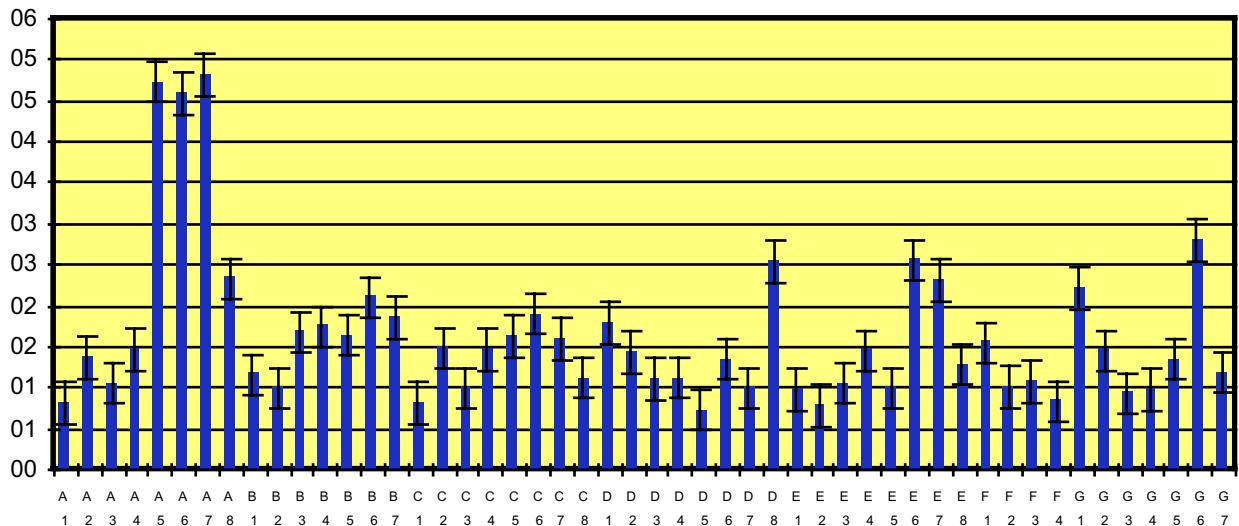
Nun ließen sich die beiden Datensätze der Multitissueblots in einer Abbildung so nebeneinander projizieren, daß ihre Relationen den in vivo-Verhältnissen entsprachen.

In der Abb. 4-6 wurde von einem Verhältnis von 1:6 des kurzen zum langen TCTP-Messenger ausgegangen. Als 100% wurde das stärkste Signal definiert, konkret handelte es sich um die TCTP-mRNA1 von glatter Muskulatur (schwarze Säule: C3). Man erkennt, daß in der TCTP-mRNA Menge der verschiedenen Gewebe große Unterschiede vorliegen. Die im Block A und B repräsentierten Hirn- und Rückenmarkgewebe enthalten weniger mRNA als die muskelreichen Geweben, wie glatte Muskelzellen, Aorta oder Herz. Der Unterschied zwischen höchstem und niedrigstem gemessenen Wert lag hier zwischen 1:50 bei der kodierenden Sonde und 1:100 bei der 3'UTR2-Sonde. Die zweithöchste mRNA-Konzentration zeigte sich in Pankreasgewebe. Zu den Geweben, die TCTP-mRNA verstärkt exprimierten, zählten weiterhin Ovarien, Speicheldrüse, Leber und Niere. Dem gegenüber standen Gewebe wie Hoden, Brustdrüse und weiße Blutzellen, die ähnlich wie das ZNS nur geringe Transkriptionsraten aufwiesen. Kaum Unterschiede waren zwischen adulten und fetalen Geweben zu beobachten, und tendenziell fand sich kein Unterschied in der Gewebeverteilung der beiden TCTP-mRNA-Varianten. Die Ähnlichkeiten der Expressionsmuster beider TCTP-mRNAs waren augenscheinlich, jedoch ließen sich im Verhältnis der beiden mRNAs in den verschiedenen Geweben auch Unterschiede feststellen. Um dies anschaulicher zu machen, wurde die Stärke der Hybridisierungssignale der kodierenden Sonde zum Verhältnis der 3'UTR2-Sonde graphisch dargestellt (Abb. 4-7).



**Abb. 4-6 Gewebeverteilung humaner TCTP-mRNA:** Poly(A)+RNA aus 50 Humanorganen wurde auf einer Blottingmembran immobilisiert und nacheinander mit je einer TCTP-kodierenden und einer TCTP-3'UTR2 Sonde hybridisiert. Die Auswertung der Signale mit Hilfe eines Phosphorimagers ermöglichte eine Quantifizierung der Signale, die proportional zur mRNA-Menge ist. Die schwarzen Säulen repräsentieren die Summe aus TCTP-mRNA1 und TCTP-mRNA2, die gelben Säulen nur die lange TCTP-mRNA2.





**Abb. 4-7 Verhältnis der kurzen zur langen TCTP-mRNA in verschiedenen Geweben des Menschen:** Hohe Quotienten wie im Gewebe Hippocampus (A7) signalisieren eine höhere Transkription des kurzen Messengers im Verhältnis zum langen. Die Y-Achse zeigt den relativen Maßstab der Verhältnisse an. Der Fehler beträgt +/- 5%.

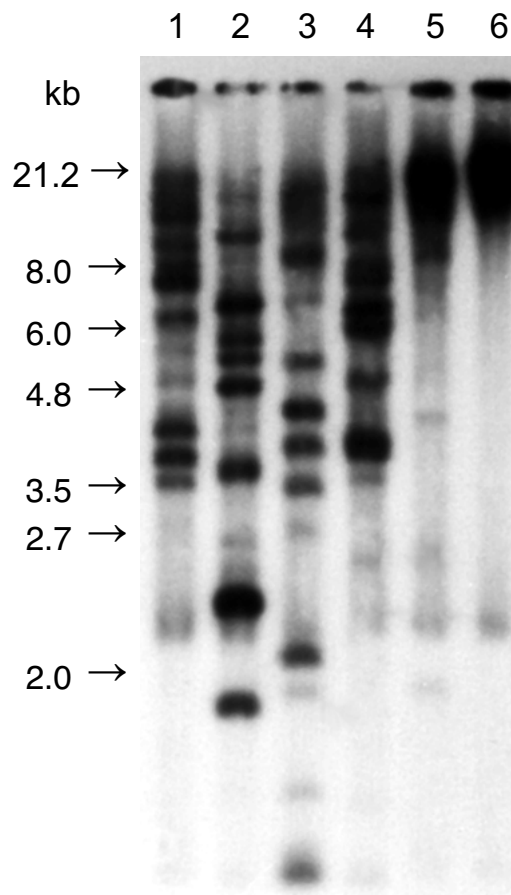
Die Ergebnisse der Abb. 4-7 lassen erkennen, daß das Verhältnis von kurzer zu langer mRNA nicht in allen Geweben konstant ist. Zwar schwankt das Verhältnis kurz/lang bei den meisten Geweben nicht mehr als um den Faktor zwei, jedoch beträgt es bei einigen (Hirnrinde A5, Frontalhirn A6, und Hippocampus A7) bis zum Faktor fünf. Kompliziert wird die Aussage durch zwei methodische Besonderheiten. Zum einen stellt die kodierende Sonde die Summe der Konzentrationen der mRNAs 1 und 2 dar, und zum anderen sind die absoluten Markierungsintensitäten der Sonden nicht identisch. Wie die Northernblots mit Kaninchen TCTP-mRNA zeigen (Abb. 4-3), die einen echten Vergleich der mRNA Konzentrationen zulassen, beträgt das geschätzte Verhältnis der kurzen zur langen mRNA in allen Geweben etwa 4-10:1. Aus den Human-Dotblots läßt sich das Verhältnis der Konzentrationen der beiden mRNAs zueinander natürlich nicht ohne weiteres ableiten. Zwei Aussagen sind jedoch durchaus korrekt zu treffen: Die Konzentrationen der Summe beider mRNAs unterscheiden sich auch beim Menschen von Gewebe zu Gewebe erheblich, bis nahezu zum Faktor 100 (Abb. 4-6, schwarze Säulen). Das gleiche trifft auch für den Gewebsvergleich der langen mRNA2 zu, die durch die spezifische Sonde eindeutig darstellbar ist (Abb 4-6, gelbe Säulen). Da beim Menschen ebenso anzunehmen ist, daß die kurze mRNA1 in allen Geweben die dominierende Form ist, spiegeln die schwarzen Säulen (Summe von mRNA1+2) im wesentlichen die Verhältnisse der Konzentrationen der mRNA1 wider. Summarisch läßt dies sicherlich den

Schluß zu, daß auch beim Menschen die Expression beider TCTP mRNAs einer gewebsspezifischen Regulation unterliegt.

## 4.2 Aufklärung der Struktur des *TPT1*-Gens des Kaninchens

### 4.2.1 Genomische Southernblots

Um erste Aussagen über die Verteilung von TCTP-ähnlichen Sequenzen im Genom des Kaninchens treffen zu können, wurden genomische Southernblots mit kodierenden Sonden hybridisiert. Die Southernblots der Abb. 4-8 zeigten erstaunlicherweise eine hohe Anzahl von Hybridisierungssignalen.



**Abb. 4-8 Genomischer Southernblot mit TCTP-kodierender Sonde hybridisiert:** Die Bahnen 1-6 entsprechen Restriktionsspaltungen mit den Enzymen *Bam*HI (1), *Eco*RV (2), *Kpn*I (3), *Xba*I (4), *Sfi*I (5) und *Not*I (6).

Für dieses Ergebnis gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Erstens hätte es sich um Artefakte handeln können, die durch Kreuzhybridisierung der Sonde mit ähnlichen Sequenzen entstehen. Zweitens wäre es denkbar, daß es sich im Falle des TCTP um eine Genfamilie mit weiteren

*TPT1*-ähnlichen Genen handelt. Drittens standen Pseudogene im Verdacht, die genomische Komplexität zu verursachen. Die dritte Hypothese war auf Grund von Versuchen, das *TPT1*-Gen der Maus zu klonieren, sehr wahrscheinlich (**Bommer, persönliche Mitteilung**). Dort waren zahlreiche Pseudogene gefunden worden, die für die erfolglose Suche nach dem Gen verantwortlich waren.

#### **4.2.2 Screening einer Lambda DASH II Phagenbank**

Um die vollständige Gensequenz aufklären zu können, war die Isolierung einer genomischen Rekombinante des *TPT1*-Gens notwendig. Dafür eignete sich die von Stratagene vertriebene Lambda DASH® II Phagenbank, die in den ersten beiden Isolierungsversuchen mit einer kodierenden TCTP cDNA Sonde gescreent wurde.

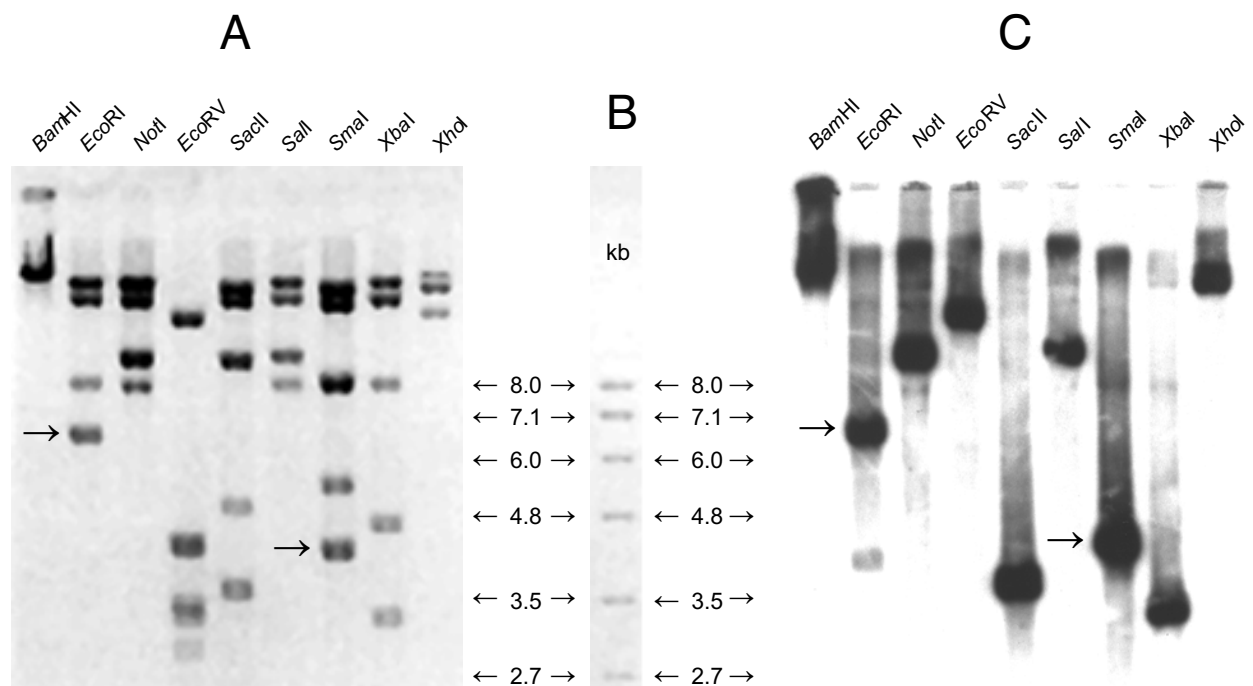
Die Komplexität der genomischen Southernblots fand ihre Bestätigung in der ersten Screeningrunde, bei der zahlreiche positive Signale gefunden wurden. Von 13 der über 30 gefundenen Primärsignale wurden Einzelplaques isoliert und anschließend Lambda-DNA präpariert. Um die Frage zu klären, ob es sich bei den gefundenen Signalen um Gene oder Pseudogene handelte, wurden Southernblots aus *SacI* gespaltener Lambda-DNA mit TCTP-spezifischen Sonden hybridisiert. Aus der TCTP-cDNA ließ sich nach *SacI*-Spaltung ein 680 bp großes Fragment vorhersagen. Diese Fragmentgröße war auch bei prozessierten Pseudogenen zu erwarten. Das Ergebnis des Southernblots ergab, daß es sich ausnahmslos um Pseudogene handelte (Ergebnisse nicht gezeigt).

Bei dem zweiten und dritten Bankscreening wurde auf PCR-Techniken zur Gen/Pseudogendifferenzierung zurückgegriffen. Mit verschiedenen Primerkombinationen wurde untersucht, ob sich von der cDNA unterscheidbare Fragmentgrößen amplifizieren ließen. Diese Technik war weniger zeitintensiv als die Untersuchung durch Southernblots, weil Sekundär- und Tertiärscreenings der gefundenen Phagenklone nicht erforderlich waren und keine Phagen-DNA-Präparation notwendig war. Als Ergebnis des zweiten Screenings wurden 20 weitere Pseudogenklone, die nicht weiter analysiert wurden, und ein Klon ( $\lambda$ H1) mit intronanalog Sequenzen identifiziert, der als Kandidat für das Gen in Frage kam. Mit einer Sonde aus einem der mutmaßlichen Introns wurde die Bank ein drittes Mal gescreent und lieferte

zwei weitere Klone. Der Klon  $\lambda$ H2 enthielt nach Ergebnissen der PCR-Kartierung vermutlich das komplette gesuchte *TPT1*-Gen und wurde weiter untersucht.

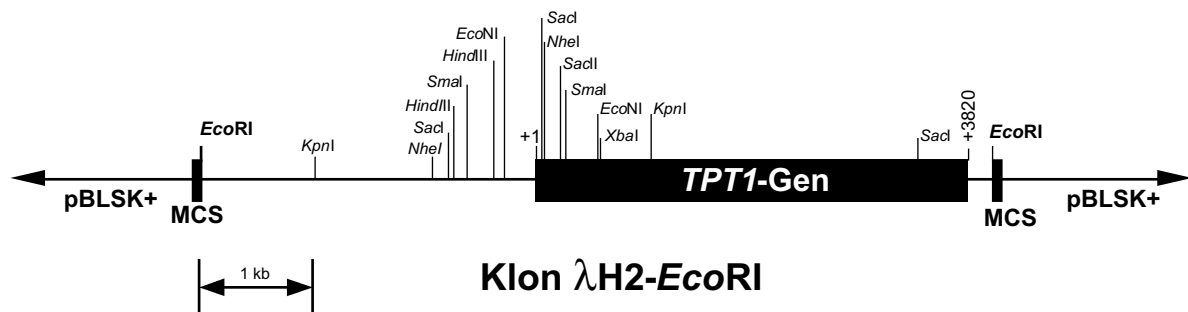
#### 4.2.3 Subklonierung und Kartierung des *TPT1*-Gens

Da eine direkte Sequenzierung von Lambda-DNA zum Zeitpunkt der Untersuchung technisch nicht möglich war, wurde eine Klonierung von Subfragmenten in einen Plasmid Vektor vorgenommen (pBluscript), der sich mit den verfügbaren Sequenzierungssystemen direkt sequenzieren ließ. Geeignete Fragmente erschlossen sich aus Southernblots, die mit  $\lambda$ H2-DNA nach Verdauung mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen entstanden (Abb. 4-9).



**Abb. 4-9 Subklonierung genomischer Fragmente:** (A) Lambdaphagen DNA des Klones  $\lambda$ H2 wurde mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen geschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt. Das dazugehörige ethidiumbromid-gefärbte Gel ist invers dargestellt. (B) repräsentiert den Molekulargewichtsmarker. (C) Southernblot des selben Gels nach Hybridisierung mit einer TCTP-kodierenden Sonde. Die Pfeile in den Abb. (A) und (C) markieren die subklonierten Fragmente.

Sowohl das 4 kb große *SmaI* Fragment als auch das 6.8 kb große *EcoRI* Fragment erschienen für eine Subklonierung geeignet, da sie die einzigen Hybridisierungssignale der Spaltungen waren. Elektrophoresebilder von *EcoRI* und *SmaI* gespaltener  $\lambda$ H2-DNA zeigten auch eine gute Zuordenbarkeit der Fragmente (Abb. 4-9), weswegen diese Fragmente weiter subkloniert wurden (Klone  $\lambda$ H2-*SmaI* und  $\lambda$ H2-*EcoRI*).



#### 4.2.4 Vollständige Sequenzierung des Gens und Aufklärung der Intron-Exon Übergänge

47



Transkriptionsfaktoren (TF) darstellen, wurde die gesamte Promotorregion einer Computeranalyse unterzogen. Hierzu wurde das MatInspector® Programm und eine Datenbank für TF (Transfac) benutzt. Das Ergebnis dieser Vorhersage ist in die Abb. 4-12 eingegangen (siehe auch Kapitel 5.2).

-1200	ATAGTATCCAAGCGATACCTATAGCATTTACGGTGAATTAATATATTCATTTTGTGGCACGGTGACTGTCTTAAGGCC	-1121																			
-1120	GGCTGGATGTGGCCTCCTGGAAACCAAGAACTTCCCAACTTTTGGGTCTCAGAAAACCATGAGAAAGACCCGCGCAGCCC	-1041																			
	IK2																				
-1040	GCGACAGGAAATTTCCACAACTTAAAGATTTGTTCTCTGGCCTACATCTATGCCTTCGAAAAGAAAAGATGCTCCTAGA	-961																			
	IK2																				
-960	AAGGGCTAAGTCCCTAATAATTGACTTTCCAGCCCTTCAAAGGCTAGCTGGGTTTGGGGGACACTCGCTATTTTGGTTTG	-881																			
	S8	MZF-1																			
-880	TTTAACCCCTAGCACCAGGGATAAAATTTCAACGTCATACTAAAGGGACAACATACCCTTTTCTTGCAAACAAAGGCCA	-801																			
-800	CACTTCAATACCAAGTGCAAAACAAAAGGGAAGAGCTCTTTGGCGGTCTGCCACAAACACGACACCCTAAGCTTTCTAAT	-721																			
	SRY	NF-1																			
-720	TCCGGACCAAACTGAAACAGACGGGAGAGCCGGGCAACCTTCCGCGCCACCTGCTTCCCTCGCGAGGTCCCTTCTCCAC	-641																			
	MYO-D																				
-640	ACTGGGCGCCCGCCGCGATTATTCCCCGGGGAGCCGGGCGGCGCTCTGGTCCCCACCCGGACAAAGGCGCCCGAGA	-561																			
	MZF-1																				
-560	ACCCAGACGGGACCGCTGTGGGCAAAGCCGGGAAGTTCTCGGAGAGCACGGGAGTTAGACAAGCACCCAGACGGCGCTG	-481																			
-480	GGTCGCCTCCAGGGGTCAGAGCCCTCCTTCCGTAAACGCAGGTCCCTCCCTCTGTAGACATGTTGCTCCAGAAAAGG	-401																			
	STAT-1																				
-400	GAGGGAAGTTGGGTGGGGCGGAAGCTTGACGAGAGTTCACGTAAGCTGCCCCAGGCCGCCCGCAGGGCAGGGTAGGGA	-321																			
-320	GGCGCAGAGCCCTCACTTCTCCACTCTCCCTAGCCGAGGGCGGAAGACCGCTCATAGAGCCCCGCCAACCCGCCCTC	-241																			
	NF-1																				
-240	CCCATCCCGCACACTCCCGCGTCCCAGCCCTCGCGTACCCGCCGAACACAGACGGCATCGCGGCTCCAGCCAAGTACCC	-161																			
	MZF-1	NF-1																			
-160	GGATGTCGCGTTTGTCCGCCCGACAGGCTAGCCGTGGCCCCGCCCGCGCTCTGCGTGCCACGTCAGTGCTT	-81																			
	ETS-1	SP-1	CREB/AP-1																		
-80	GCGGCGCTTCCGGGAGCGCAGCGGACGATGACGTAGAAGGACGTGCCCTCTATATGAGGTTGGGAGCGGCTGAGTCGGC	-1																			
	ETS-1	CREB/AP-1	*TBF	MZF-1																	
+1	CTTTTCCGCCCGCTCCCCCTACCCCGAGGGCCGCTCCGGCTGCACCGCTCGCTCTGAGCTCCGGGCTCCTGCCAAGC	80																			
	MZF-1	NF-1																			
81	TAGCGCCGCGCTGTCGTCTCCTACCAGCCGCCATC	ATG	ATT	ATC	TAC	CGG	GAC	CTC	ATC	AGC	C	gtgag	149								
1		M	I	I	Y	R	D	L	I	S	H		10								
150	tttgactgcactaccccccttggtgccgcacacggcttgggtgcgggtggggcgggacgcccgccgggccccagggcagcgc	229																			
230	cggcggtttttccgaagcgaggagggtcgggtgcctgggacacgcgccccggggagggcgggggcgcggtgcggcagccg	309																			
310	gcgcgggaaatggcgccggcgcggtgtgacggcgcggtctctgtccccgcgcag	AC	GAT	GAG	ATG	TTC	TCC	381													
11		D	E	M	F	S		15													
382	GAC	ATC	TAC	AAG	ATC	CGG	GAG	ATC	GCG	GGC	GGA	CTG	TGC	CTG	GAG	GTG	GAG	GGG	AAG	gtga	442
16	D	I	Y	K	I	R	E	I	A	G	G	L	C	L	E	V	E	G	K		34
443	gtcgtcggggcgccgcgcgggggaggcgaggccggcggggctcgggtttccgccgacccccctccgaggttgcaat	522																			
523	cctccccgcccctcctggcgaggagacgctctttccgggcttgggtttttctagaaaagtggaggcgagctgagcct	602																			
603	gtaaataggtccgctgcctcggcgcccatcctcctcctggcgtccgggacaggtctctgctttggcagtgccaagccc	682																			
683	tcggactttggcctttcctgctttctcaacgctgagtgccacaactggacacctcttccctttgcttgtaaaggactccgt	762																			
763	tttcgtttagtcaacagaccatgagtgcttgctgagttggatagcaagggtcatgggtgacttctctccagtgcgcg	842																			
843	cgtgggttttccctgagatctaggaacgtttgttgagatgggtgggtgagttaggaagtgtttccgccttcccagcttaa	922																			
923	ctgctttttcttaatgcag	ATG	GTC	AGT	AGG	ACA	GAG	GGT	AAC	ATT	GAT	GAT	TCG	CTC	ATC	GGT	986				
35		M	V	S	R	T	E	G	N	I	D	D	S	L	I	G	49				
987	GGG	AAT	GCC	TCC	GCC	GAA	GGG	CCG	GAG	GGC	GAA	GGT	ACC	GAA	AGC	ACA	GTG	ATC	ACT	GGT	1046
50	G	N	A	S	A	E	G	P	E	G	E	G	T	E	S	T	V	I	T	G	69

1047	GTT	GAT	ATT	GTC	ATG	AAC	CAT	CAC	CTG	CAG	GAA	ACC	AGC	TTC	ACA	AAA	GAA	GCC	TAC	AAG	1106	
70	V	D	I	V	M	N	H	H	L	Q	E	T	S	F	T	K	E	A	Y	K	89	
1107	AAG	TAC	ATC	AAA	GAT	TAC	ATG	AAA	TC	gtaagtgggtcccagcaacgcacagctcatgtgtggactcttaaaa											1177	
90	K	Y	I	K	D	Y	M	K	S												98	
1178	ggatttagggatgggctggcttgagctcctttaacagtagacagacttggtgaaagaccctaggtgggggctttgctttt																				1257	
1258	tgctaccttctgagcaatgtgagcatactggagtagtgctttggaactagtaagcgtgaaattcagaattgtaaataattc																				1337	
1338	acggaagaccctgtctatagcctagtataactgaatcttccccatgttacttttctcttttcttttggatggtctgaat																				1417	
1418	ttacttttttttaaaaaataacacgttaataaaatgttgttccag										A	ATC	AAA	GGC	AAA	CTT	GAA	GAA	CAG	1488		
99											I	K	G	K	L	E	E	Q	106			
1489	AGA	CCA	GAG	AGA	GTA	AAA	CCT	TTT	ATG	ACA	GGG	GCT	GCA	GAA	CAA	ATC	AAG	CAC	ATC	CTT	1548	
107	R	P	E	R	V	K	P	F	M	T	G	A	A	E	Q	I	K	H	I	L	126	
1549	GCT	AAT	TTC	AAA	AAC	TAC	CAG	gtaaacatcttgaaatattgggatcgaataatttatggttttaactgcaaga													1621	
127	A	N	F	K	N	Y	Q														133	
1622	acaaaaaatgacttcattgatctgtaacagcgaagtgttggtcttgagctgggttaaatttagcttcataggatcaggag																				1701	
1702	cagcagtcacatctgtgctttgtcttcagatccccatctactgattgaaaagcctaccaccacccaccttgctttgttttcc																				1781	
1782	cagattacatttctcttggttgcttccctaacctcttaagtcttccaacttttctctttacagttccattgtgttggtac																				1861	
1862	ttttttttcttttttaacttaagtgacttccctctactttcattaaaaaaaaaaaaaccacaggggctcttaatttccc																				1941	
1942	agctgtcatatctattggctgtgagatagttccctatgtgataatactttgtgtgcagtattgtgttccctgtgttt																				2021	
2022	ggttatgtcaattggcttgtaggttttggaattgtgcatgtagggctgagaaagtagatttccagaaatgctaaagtgtt																				2101	
2102	ttgttgctctgtactcttactgtggtcagcatttgtgctttagtcaagtgaacagatgtttgtgattaatgagcatttc																				2181	
2182	taggcatcagcttctggttgcaaaaatttgattttgtagtattctgaatcatcctttgttgcttgtagtttattggata																				2261	
2262	ggatacatgtttgtatgcagtggtcttaattctgggtacttgtttgtttctcaag										TTC	TAT	ATT	GGT	GAA	AAC	2333					
134											F	Y	I	G	E	N	139					
2334	ATG	AAT	CCA	GAT	GGC	ATG	GTT	GCT	CTG	CTG	GAC	TAC	CGT	GAG	GAT	GGT	GTG	ACC	CCG	TTT	2393	
140	M	N	P	D	G	M	V	A	L	L	D	Y	R	E	D	G	V	T	P	F	159	
2394	ATG	ATT	TTC	TTT	AAG	GAT	GGT	TTA	GAG	ATG	GAA	AAA	TGT	gtaagtatgaggaagtgggttgggatta							2460	
160	M	I	F	F	K	D	G	L	E	M	E	K	C								172	
2461	aatgatataaaaatggagttactttgggtgtgagctcactgtctaatgccacagagatgggtgccatagattctacagt																				2540	
2541	tttctctttaaagtgtgatccattttcttctgggttgggtcttaaaaaagatgatgttcacatgtaaaagataacagtat																				2620	
2621	ttaaaagggcttagaatcttgattctctaggaagtttagttagtaggacattccgcaatttaacagctggtgagcagaga																				2700	
2701	agcctctacgttgatcttccatagataatggcctcattctcattctatgctcacctttgccatgcctgggtgagtctc																				2780	
2781	aagtctttcaccttgtagctaatcattgaaaacttttaggagattgttagcttttagtaatacagttggagctgactg																				2860	
2861	ttgaactgataggcaaattgcattagtaaacacagggcactgtttaagctgtacagaaacaaaagcattctttgtcctg																				2940	
2941	gatttcaggagacttaaagctgtgttaacaagattagggcaagatgacttgccaaaggaaggttattcagatagtaac																				3020	
3021	cggagttttgttggtagaacgcggtgtgagtgggacttgggaacttctctggaaaatgttacctctgctttggtgagga																				3100	
3101	tgctctgcatccactgatagacctgaacagtctgctgttgttcttttgggttgcaataggatgcaaaggaatccct																				3180	
3181	gcgtttctgtctgtctttgtggcagcccagattgaattgggggatacattttagcctagaaatgttgcttgagagtg																				3260	
3261	tgaagtaattttttttttttttcttcag										TAA	CAAAGTTGGCAATTTGGATCTATCACTGCTCATCGTAACTGGCTGCT										3338
173											STOP											173
3339	GCTTGTCATCCACACAACACCAGGATTTACAGGAAGTGGGACTGATGTTATGTTGAGCTCCTCACTTATTTGACCATGA																				3418	
3419	TTTACTTCAAGTGGAGGCATTGTTTTTAAGGCCAAAAACATTGTCATGTAGGTTGTCTAAATTAATATGCATTTAAATT																				3498	
3499	CATTGAGAGAATGCCTATTAGTTTAATGTACATTTAAGCTAAATCCATCCTGTAGTGTTCCTGGAGAAGCTAAAGCCT																				3578	
	↑	Beginn der 3'UTR2																				
3579	GGTTGTAGACACTACTAGAAAGCATAAGACTGTCTTCAGATAACTTCTACAGTGAAAAGTGTGGGACTGGAATATAAA																				3658	



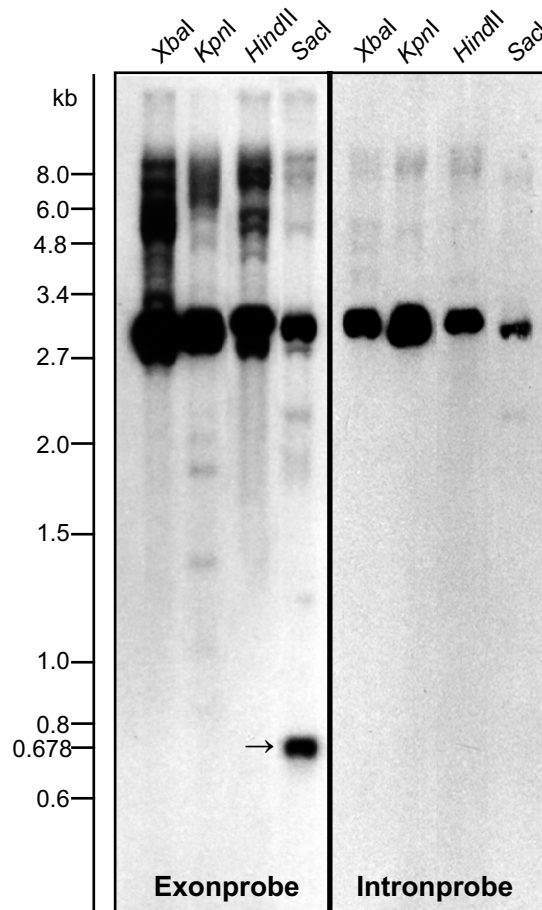
3659	CTGAGAATCCAAAGTTAAATTCTGAATTACAGTAAAGGGAAAAACCATGCTCATAGCAGTGCCAACATTTGAAGTGGAGC	3738
3739	CTTAACACATTTTCATCACCTACAACGGAAGTAGCTAACTGGAAGAGATTACCAAAGAATAAAGAGAGACTGATTGAGTT	3818
3819	G	3819

**Abb. 4-12 TPT1-Gensequenz des Kaninchens (EMBL-Datenbank AJ225898):** Im Promotor wurden Bindungsregionen für Transkriptionsfaktoren mit dem Programm "Matinspektor" vorhergesagt (Quandt et al. 1995) und unterstrichen dargestellt. Introns sind in Kleinbuchstaben angegeben. In der 3'UTR sind zusätzlich das STOP-Kodon, der Beginn der 3'UTR2 und die Polyadenylierungssignale (AATAAA) durch Unterstreichung hervorgehoben.

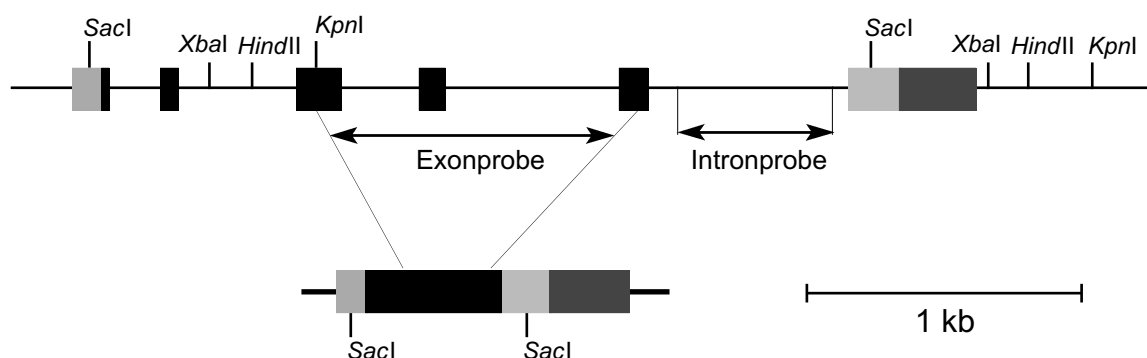
#### 4.2.5 Genomische Southernblots mit intron- und exonkodierenden Sonden

Mit der Sequenzierung des Gens waren alle intronischen Sequenzen bekannt. Mit Hilfe markierter Intronsonden sollte nun gezeigt werden, ob die Komplexität der genomischen Southernblots ausschließlich auf Pseudogensequenzen zurückzuführen waren. Dazu wurden genomische Southernblots mit kodierenden Sonden und Sonden aus intronischen Bereichen hybridisiert (Abb. 4-13).

Der Vergleich der autoradiographischen Bilder zeigte in der Tat eine Reduzierung des Bandenmusters auf einzelne vollständig aus der Struktur eines unikaligen *TPT1*-Gens vorhersagbare Banden. Insbesondere die *SacI* Spaltung war hinsichtlich der Interpretation der Signale gut geeignet, da es unter den ausgewählten Enzymen das einzige war, das im Gen zweimal spaltete (Abb. 4-14).



**Abb. 4-13 Vergleich der genomischen Southernblotmuster nach Hybridisierung mit einer exon- und einer intronspezifischen *TPT1*-Sonde:** Die Komplexität der Bandenmuster im exonspezifischen Blot reduziert sich auf einzelne vorhersagbaren Banden im intronspezifischen Blot. Diese Gegenüberstellung legt den zwingenden Schluß nahe, daß die genomische Komplexität der Southernblots allein durch die zahlreichen gefundenen Pseudogene verantwortet wird. Die Pseudogene akkumulieren innerhalb der mit dem Pfeil markierten Bande nach *SacI* Spaltung.



**Abb. 4-14 Gegenüberstellung von *TPT1*-Gen und *TPT1*-Pseudogenen hinsichtlich der Lage der verwendeten Sonden und Restriktionsendonukleasen im Southernblot der Abb. 4-13:** Am aussagekräftigsten ist die Spaltung mit *SacI*. Während im Gen ein Fragment der Größe 3 kb entsteht, liegt die Fragmentgröße bei prozessierten Pseudogenen im Bereich der homologen cDNA, d.h. 0,68 kb. Dieses Fragment akkumuliert bei allen Pseudogenen gleichermaßen und erzeugt die charakteristische starke Bande im kodierend-spezifischen Blot. Alle anderen Schnittorte lassen nur im Falle des Gens bei den Enzymen *XbaI*, *HindIII* und *KpnI* eine Zuordnung erkennen, da Spaltorte in der unbekannten Genumgebung eine Rolle spielen.

### **4.3 Funktionelle Analyse der Promotorregion des *TPT1*-Gens des Kaninchens**

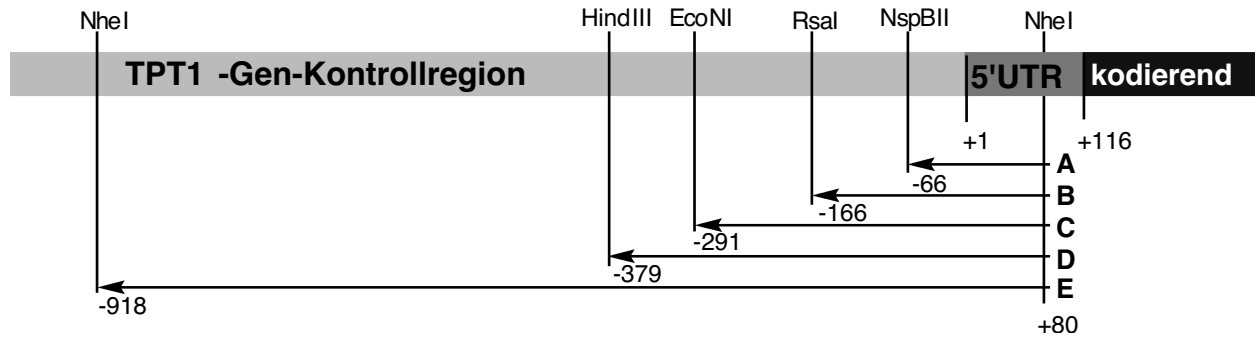
Eines der Ziele dieser Arbeit bestand in der Analyse der regulativen Sequenzen, die für die Expressionssteuerung auf der Ebene der Transkription verantwortlich sind. In den meisten Fällen sind dafür die stromaufwärts der 5'UTR gelegenen Sequenzen zuständig. In diesem etwa 500 bis 1000 bp langen Sequenzabschnitt befinden sich die modular aufgebauten Bindungsstellen für ausgewählte TF, deren Anwesenheit die Ansammlung allgemeiner TF an der TATA-Box beschleunigen oder verlangsamen bzw. inhibieren. In einigen Fällen befinden sich diese als Enhancer oder Silencer bezeichneten DNA-Sequenzen auch weiter stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt entfernt, bzw. in einem der Introns oder auch stromabwärts des Gens (siehe Kap. 2.3.4).

Ausgehend von der wahrscheinlichsten Konstellation, daß die Regulation des *TPT1*-Gens innerhalb von 1 kb der stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes gelegenen Sequenzen stattfindet, sollte dieser Bereich funktionell näher untersucht werden.

#### **4.3.1 Klonierung von *CAT*-Reportergenkonstrukten aus Teilen des Promotors**

Ein weit verbreitetes Modell zur Untersuchung der Promotoraktivität eines Sequenzbereiches ist seine Beurteilung mit Hilfe von *CAT*-Assays. Hierbei wird das Gen, der in Eukaryontenzellen nicht vorkommenden Chloramphenicoltransferase (*CAT*) als Reportergen benutzt. Man koppelt den zu untersuchenden Promotor an das promotorlose *cat*-Gen und transfiziert damit eine neoplastisch transformierte Zelllinie. Nur wenn der Promotor über Verstärkerelemente verfügt, kommt es in den transfizierten Zellen zur Synthese des *CAT*-Enzyms, dessen Aktivität quantifiziert werden kann und direkte Aussagen zur Stärke des Promotors zuläßt.

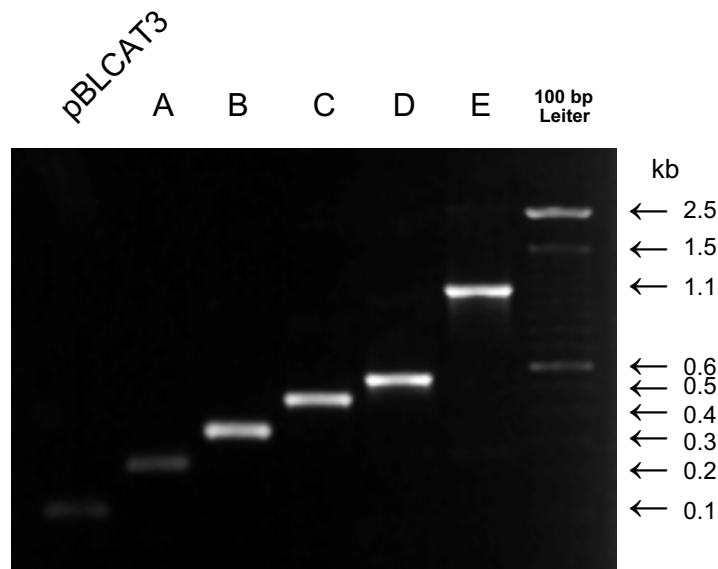
Ziel war es, eine Serie von *CAT*-Reportergenkonstrukten mit Teilen des Promotors verschiedener Länge zu klonieren, mit diesen Konstrukten eine Kaninchenzelllinie zu transfizieren und die Promotoraktivitäten untereinander zu vergleichen. Ausgangspunkt der Klonierungen war die Sequenz des Promotors, der auf eine Länge von 1,2 kb sequenziert wurde. Jetzt war es möglich, geeignete Restriktionsenzyme auszusuchen, deren Schnittstellen Fragmente der gewünschten Länge erzeugen (Abb. 4-15).



**Abb. 4-15 Fragmentierung der *TPT1*-Gen-Kontrollregion:** Durch Auswahl verschiedener Restriktionsendonukleasen konnte der Bereich des Promotors in Bereiche unterteilt werden. Alle Fragmente (A-E) beginnen an der Position +80, die sich innerhalb der 5' UTR des Gens befindet. Die 5 stromaufwärts gelegenen Spaltstellen decken den Bereich von -66 bis -918 ab.

Als Vektor für die Transfektionsexperimente diente das Plasmid pBLCAT3 (Luckow und Schütz 1987). Dieses Plasmid kodiert für ein *cat*-Gen, dem ein Multiklonierort (MCS) unmittelbar vorangestellt ist. Nach Einbau der Promotorfragmente A-E (Abb. 4-15) in den MCS standen fünf Konstrukte zur Testung der Promotorstärke zur Verfügung.

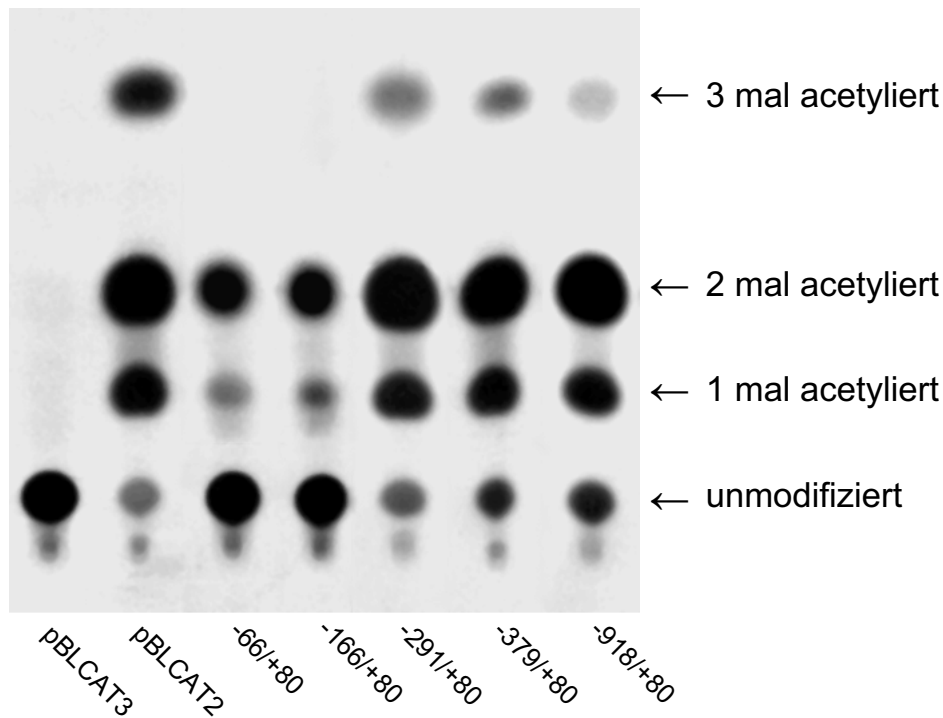
Um zu überprüfen, ob der Einbau der Fragmente in den Vektor erfolgreich war, diente ein PCR-System. Zwei Primer flankieren hierbei den MCS des Vektors. Nach erfolgter Amplifikation gab die Länge des Amplifikats direkten Aufschluß über die Insertgröße und damit den Erfolg der Klonierung (Abb. 4-16).



**Abb. 4-16 PCR-Screening auf Fusions-Konstrukte von *TPT1*-Promotor-Fragmenten mit dem *cat*-Gen:** Die Bahnen A-E entsprechen den Fragmenten aus Abb. 4-15. Dargestellt sind die PCR-Produkte, die nach Amplifikation des MCS des Vektors pBLCAT3 inklusive Insert entstanden. Die erste Bahn repräsentiert den MCS ohne Insert.

#### **4.3.2 Transfektion von glatten Kaninchenmuskelzellen (SMC) mit TPT1-Promotorgenkonstrukten**

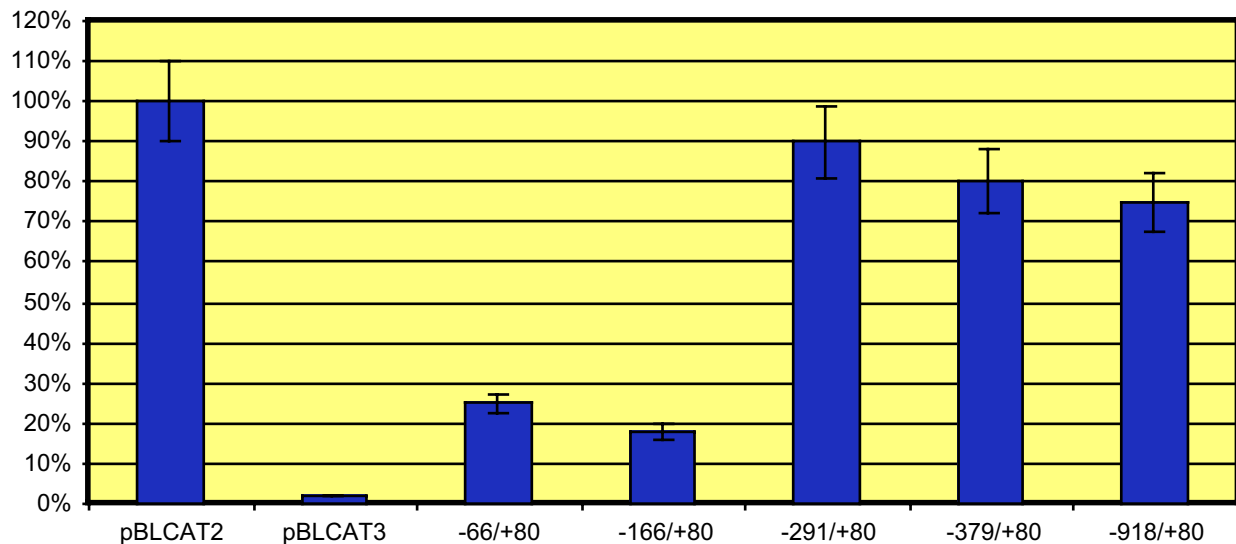
Nachdem die Konstrukte vorlagen, war der nächste Schritt ihre Analyse durch Zelltransfektionsexperimente in einer geeigneten Zelllinie. Gute Voraussetzungen für eine effektive Transfektion sollten Zellen aus Geweben mit einer hohen *TPT1* Expression haben (Abb. 4-6.). Dafür kamen Zellen eines Rhabdomyoms des Kaninchens (SMC=smooth muscle cell) in Frage. In einem Verfahren, auf das im Kapitel Methoden näher eingegangen wird, wurden die mit Hilfe der CAT-Reaktion hergestellten radioaktiv  $^{14}\text{C}$ -markierten Acetylierungsprodukte des Chloramphenicols aus den Zellen angereichert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und quantifiziert. Die natürliche Funktion der Chloramphenicol-Acetylierung durch CAT in Bakterien besteht in der Vermittlung einer Resistenz gegenüber dem Antibiotikum durch diese Modifizierung. Es existieren drei Acetylierungsstellen auf dem Molekül, und jede dieser Isoformen kann durch die Dünnschichtchromatographie voneinander getrennt werden. Nach der Trennung fertigt man autoradiographische Aufnahmen an. Die Stärke der Summe aller acetylierten Chloramphenicolsignale ist direkt proportional zur Enzymaktivität und damit zur Promotorstärke. Genau quantifizierbar werden die Signale durch Ausschneiden der markierten Acetylierungsflecke aus der Dünnschichtfolie und Bestimmen der Radioaktivität mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler. Dieses Verfahren wurde 3-4 mal mit jedem der CAT-Konstrukte wiederholt. In Abb. 4-17 ist beispielhaft eine autoradiographische Aufnahme eines CAT-Assays dargestellt.



**Abb. 4-17 Dünnschichtchromatographische CAT-Analyse aller untersuchter TPT1-Promotorkonstrukte:** Neben einer Positiv- (pBLCAT2) und einer Negativkontrolle (pBLCAT3) sind die Aktivitäten aller Promotorkonstrukte aufgetragen. Die Schwärzungen entsprechen unterschiedlich oft acetyliertem Chloramphenicol. Die Summe aller acetylierten Signale ist der CAT-Aktivität und damit der Promotorstärke äquivalent.

Parallel dazu wurden alle Transfektionsansätze mit dem Plasmid pSV $\beta$ -Gal transfiziert. Dieses enthält ein  $\beta$ -Galaktosidasegen in Verbindung mit einem starken viralen Promotor (CMV=Cytomegalievirus). Die Aktivität dieses Enzymes kann wiederum gemessen werden. Dies ist notwendig, da die Transfektionseffizienz gewissen Schwankungen unterworfen ist. Mit Hilfe der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wird jeder CAT-Assay kalibriert und dieser Fehler dadurch eliminiert. Um die Ergebnisse statistisch zu sichern, wurden alle Assays 3-4 mal wiederholt und der Mittelwert gebildet. Als Positivkontrolle kam der Vektor pBLCAT2 zur Anwendung, der die CAT in Verbindung mit dem starken Thymidinkinasepromotor des Herpes-Simplex-Virus exprimiert. Alle Werte beziehen sich auf diese CAT-Aktivität, die als 100% definiert wird. Als Negativkontrolle diente der Vektor pBLCAT3 (*cat*-Gen ohne Promotor).

Aus allen Daten resultierte eine Aussage über die Promotorstärke der verschiedenen CAT-Konstrukte im Vergleich mit einem bekannten starken viralen Promotor (Abb. 4-18).



**Abb. 4-18 Die Promotor-Stärke verschieden langer *TPT1*-Gen-Promotorbereiche im Vergleich mit einem starken viralen Promotor (pBLCAT2) ausgedrückt als relative CAT-Aktivitäten:** Als Negativkontrolle fungierte das Plasmid pBLCAT3, das den Ausgangsvektor ohne Insert, d.h. ohne Promotor, repräsentiert. Die Zuordnung der Promotorfragmente zu den anderen Konstrukten erschließt sich aus **Abb. 4-15**

Wie man deutlich erkennen kann, ist der *TPT1*-Promotor durch eine starke Aktivität gekennzeichnet. Schon im Bereich von -66 bis -166 zeigte sich eine Aktivität von etwa 20-25% der Positivkontrolle. Das nächst längere Fragment bei -379 bp zeigt dann einen sprunghaften Anstieg der Aktivität bis zu 90-95% des viralen Promotors. Dieser Wert fällt bei den noch längeren Konstrukten wieder leicht auf Werte zwischen 75 und 80% ab. Eine Diskussion und Interpretation dieser Daten findet im Kapitel 5.2 statt.

#### 4.3.3 Transfektion einer humanen Zelllinie mit dem CAT-Konstrukt -918/+80

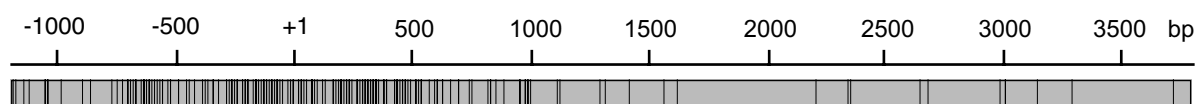
Parallel zu den Versuchen mit einer Kaninchenzelllinie bot sich die Möglichkeit an, humane K562 Zellen (eine hämatopoetische Erythroleukämiezelllinie) zu verwenden. Es wurde hier jedoch nur eines der CAT-Reportergenkonstrukte getestet. Es handelte sich um das 997 bp große Fragment aus dem Promotor des *TPT1*-Gens. Erstaunlicherweise war auch in menschlichen Zellen eine Aktivität von etwa 40 % der Kontrolle meßbar (Ergebnisse nicht gezeigt). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß sowohl die an der Transkriptionregulation beteiligten TF als auch die DNA-Bindungsstellen im Verlaufe der Evolution konserviert sein müssen. Ein Vergleich der *TPT1*-Genkontrollregion verschiedener Spezies könnte so wertvolle Hinweise auf konservierte Bereiche und mögliche TF liefern.

#### 4.3.4 Analyse der CpG-Inseln des TPT1-Gens

Unter CpG-Inseln versteht man die statistisch signifikante Häufung von CG-reichen Sequenzen in der unmittelbaren Umgebung des Transkriptionsstartpunktes aktiver Gene. Wie es zu dieser Anhäufung kam, steht wahrscheinlich mit der vermuteten Funktion der DNA-Methylierung in Zusammenhang. Vertebraten besitzen spezifische Enzyme zur Methylierung von CG-Sequenzen. Die Funktion dieser Modifikation scheint in der entgültigen Stillegung transkriptionell inaktiver genomischer Bereiche zu liegen. Möglicherweise ist dies das Ergebnis einer alternativen Chromatinstruktur (**Tazi und Bird 1990**) oder von spezifischen Proteinen, die methylierte CG-Sequenzen erkennen, binden und transkriptionell inaktivieren (**Tate und Bird 1993, Nan et al. 1998**).

Da methylierte CpG-Sequenzen durch ineffektivere Reparaturmechanismen desaminierten 5-Methyl-C dazu tendieren, im Laufe der Evolution zu mutieren, blieben diese Sequenzen in Bereichen aktiver Transkription, die unmethyliert bleiben, in Form von CpG-Inseln erhalten. CpG-Inseln hat man bislang in der Umgebung aller Haushaltsgene und vieler gewebsspezifischer Gene gefunden. Sie scheinen ein Merkmal transkriptionell aktiver Gene zu sein. Für die Genomforschung sind CpG Inseln sehr interessant, da sie Hinweise auf mögliche Gene in uncharakterisierten genomischen Sequenzen geben, wie sie z.B. in großer Menge beim humanen Genomprojekt anfallen. Man schätzt, daß etwa 56% der Humangene mit einer CpG Insel assoziiert sind und etwa 45000 CpG Inseln insgesamt existieren (**Brown 1999**).

Eine interessante Frage war nun, ob das Gen des TCTP ebenfalls eine Häufung von CG-reichen Sequenzen besitzt, was ein weiteres Argument dafür liefern würde, daß wirklich das aktive *TPT1*-Gen isoliert worden war. Eine einfache Sequenzuntersuchung bestätigte dies. Die graphische Darstellung des Gens und seiner Umgebung zeigt, daß sich im Bereich des Transkriptionsstartpunktes eine CpG-Insel befindet (Abb. 4-19).



**Abb. 4-19 CpG-Insel im Bereich des TPT1-Gens:** Alle CGSequenzen innerhalb des *TPT1*-Gens und des flankierenden stromaufwärts gelegenen Bereiches sind als senkrechte Striche dargestellt. Der Transkriptionsstart befindet sich an der Position +1 bp. Man erkennt eine Häufung von CG-Sequenzen in diesem Bereich.



#### **4.3.5 Mögliche TF-Bindungsstellen im TPT1-Promotor des Kaninchens**

Nachdem die Kaninchen-Promotorsequenz bekannt war, konnte nach Bindungsstellen für in Frage kommende TF gesucht werden. Dazu wurde die TF-Datenbank Transfac® (<http://transfac.gbf.de>) unter Zuhilfenahme des Programmes MatInspector (Quandt et al. 1995) benutzt. Berücksichtigt man nur diejenigen Faktoren, deren Kernbindungsmotiv zu 100% und deren flankierende Bindungsbereiche zu mehr als 95% zum gefundenen Konsensusmotiv homolog sind, so befinden sich im kleinsten CAT-Konstrukt Bindungsmotive für die TF NF-1, MZF-1 (2x) und CREB/AP-1. Das nächst größere Fragment (-166/+80) hat Bindungsmotive für ETS-1 (2x), AP-1/CREB und SP-1. Im Fragment -279/+80 finden sich Bindungsstellen für NF-1 (2x) und MZF-1. Weiter stromabwärts existieren cis-Motive für STAT-1, MYO-D, NF-1, SRY, S8 und IK2. Die Diskussion dieser Faktoren findet im Kap. 5.2 statt.

#### **4.4 Aufklärung der Struktur des humanen TPT1-Gens**

1996 kam es zur Veröffentlichung von Teilen der humanen *TPT1*-Genstruktur (Bonaldo et al. 1996). Die publizierte Sequenz bestand aus den Exons 2-7 einschließlich kurzer Intron/Exon Übergänge. Promotor und Exon 1 fehlten vollständig und lediglich vom kurzen Intron 3 war eine vollständige Sequenz vorhanden. Die Gensequenz war ein Teilergebnis des Versuches, Chromosom-13 spezifische Gene zu finden. Die Ergebnisse dieser Arbeit fielen zeitlich mit den Bemühungen unserer Gruppe zusammen, zusätzlich zum Kaninchengen das humane *TPT1*-Gen zu klonieren. Wegen der Unvollständigkeit der publizierten Sequenz, insbesondere des fehlenden Promotors, entschlossen wir uns somit zur Aufklärung der fehlenden Teile.

Als Vorgehensweise zur Klonierung des Humangens boten sich Alternativen zur Herangehensweise der Klonierung des Kaninchengens an. Diese bestanden in der Benutzung einer kommerzieller P1-Bank. (Gene Discovery Array von Genome Systems Inc.). Ein Satz an Nylonfiltern repräsentiert das Genom 2-3 mal. Jeder Spot ist einem definierten Klon zugeordnet und kann nach Identifizierung bestellt werden. Die Hybridisierung der Bank mit kodierenden Sonden hätte sich wegen der sich abzeichnenden Situation der Existenz multipler Pseudogene jedoch fatal ausgewirkt. Analog zum Kaninchen wären eine große Zahl von Klonen zu untersuchen gewesen. Deshalb wurde der Versuch unternommen, zuerst intronische Sequenzen mittels genomischer PCR zu amplifizieren, um dann eine intronische Sequenz als Sonde zu

benutzen. Beim Kaninchen hatte der Versuch mittels PCR derartige Sequenzen zu klonieren immer zu Pseudogenamplifikaten geführt, wahrscheinlich zurückzuführen auf die ausgeprägt hohen Homologien einiger Pseudogene zum Gen. Beim Menschen, warum auch immer, führte diese Strategie jedoch zum Erfolg. Mit Hilfe der speziesübergreifenden Primerkombination LX2h4/HMO-TAP-R1 konnte ein genomisches Fragment gewonnen und kloniert werden (**Berger, unveröffentlicht**). Aus diesem Fragment erschlossen sich Teilsequenzen aus den Introns 3 und 4. Mit Hilfe eines Intron 4 spezifischen Primerpaares (hP23I4H/hP23I4R) konnte ein 290 bp langes Amplifikat aus Intron 4 generiert und als Sonde zur Hybridisierung der P1-Bank eingesetzt werden. Das Screening der P1-Bank wurde von Dr. Carola Marcinek in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Peter Nürnberg durchgeführt und führte zu zwei Signalen im Autoradiogramm. Beide Klone wurden bestellt und weiter analysiert. Der Klon 231/E12 enthielt nach Ergebnissen der PCR-Kartierung das gesuchte humane *TPT1*-Gen. Geeignete Restriktionsfragmente wurden dann subkloniert und vollständig sequenziert.

Die vorläufigen Sequenzdaten bedürfen noch der weiteren Verifizierung. Aus diesem Grund erfolgte noch kein Datenbankeintrag, und auf die vollständige Darstellung der Sequenz wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet. Die wesentlichen Aspekte der Struktur des Human-*TPT1*-Gens gehen jedoch aus Abb. 4-20, Abb. 5-1, Abb. 5-3 und Tabelle 6 hervor. Das Humangen ist mit 4269 bp um 450 bp länger als das Kaninchengen. Die Differenz geht überwiegend auf unterschiedliche Längen der Introns zurück. Den größten Beitrag hierzu liefert das humane Intron 5, das mit 1220 bp um 364 bp länger als das entsprechende Kaninchenintron ist. Wie schon erwähnt, ist die Struktur der Exons und Introns absolut konserviert. Die Längen der Exons 2 bis 5 stimmen mit 74 bp, 191 bp, 106 bp und 117 bp mit dem Kaninchengen überein. Längendifferenzen des ersten (142 bp) und letzten (517 bp) Exons gehen auf Unterschiede der UTRs zurück. Die Längen der Introns 1 bis 5 betragen 255 bp, 525 bp, 391 bp, 721 bp und 1220 bp. Die weitere Diskussion von Unterschieden beider Gene findet im Kap. 5.1 statt.

Insgesamt war es möglich, 500 bp des humanen *TPT1*-Promotors zu sequenzieren. Analog zur Vorgehensweise beim Kaninchen wurden diese Sequenzen auf Bindungsstellen für TF abgesucht (Kap. 4.3.5). Die Sequenz des Human-*TPT1*-Promotors und die Positionen möglicherweise involvierter TF zeigt Abb. 4-20.

-500	AGATCTACCCCAGGCCAGAGG	-481
-480	GCCTGACCCTCCCTAAATGCGACGTTCTCCTACCTTGGTTGATACTCACGT <u>TCCCAGAAA</u> AGGGTGGAACTAGGCTGGA	-401
	STAT-1	
-400	CGAGGCGCAGGGCCAAAGTTTAATTCCTCTAAGCTCCACCCAGCTCCCAGCACCTCTCCAGGCGCCCCGTGGGGTAGGG	-321
	TST-1 CP-2	
-320	CGGAGCCGGGTCAAACGTACTCCGCTT <u>CCCCCGCT</u> CCACCCACCCAGGGCTAGGGAGCGCCCCGAGAGTTGGCTCCCTC	-241
	MZF-1	
-240	<u>CCCACT</u> GGGGGCGCACCT <u>CCCCGCCCC</u> ACCCCTACCCGCTGGCGTACCCAGTGAACGGAGCCTTGTGTCTCCGCCTCA	-161
	MZF-1 SP-1	
-160	AGT <u>CCCGGATGCT</u> CACCT <u>CCCCGACT</u> CGCCCCGCTGT <u>GGCCCCGCCCCG</u> CGCGGCTCTTCGTGCCACGTCACCGCCT	-81
	ETS-1 MZF-1 SP-1 CREB/AP-1	
-80	GCGTCGCTTCCGGAGGCGCAGCGGGCGATGACGTACGGGACGTGCCCTCTATATGAGGTTGGGGAGCGGCTGAGTCGGC	-1
	ETS-1 CREB/AP-1 TBF MZF-1	

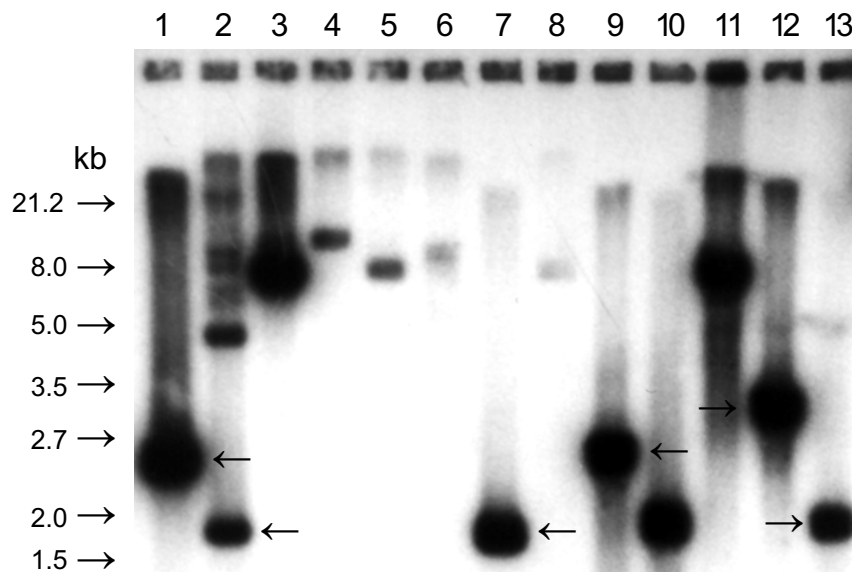
**Abb. 4-20 Sequenz des Human-*TPT1*-Promotors und die Positionen potentieller TF-Bindungsstellen**

Der direkte Vergleich der Promotoren der Spezies Mensch und Kaninchen lieferte wichtige Anhaltspunkte für konservierte TF-Bindungsstellen. Näheres hierzu im Kap. 5.2.2.

## 4.5 Analyse von 13 *TPT1*-Pseudogenklonen

### 4.5.1 Subklonierung von genomischen Fragmenten

Im Kapitel 4.2.1 wurde darauf eingegangen, daß genomische Southernblots mit TCTP-kodierenden Sonden sehr komplex erschienen und die Vermutung geäußert, daß es sich dabei um Pseudogene handeln könnte. Eine endgültige Bestätigung konnten jedoch nur Sequenzierungen liefern. Dazu mußten die 13 isolierten *TPT1* positiven Lambdaklone subkloniert werden. Eine Auswahl von Fragmenten erschloß sich aus Southernblots mit gereinigter Lambda-DNA. Insbesondere die *EcoRI* Fragmente vieler Lambdaklone waren auf Grund ihrer günstigen Größe für Subklonierungen geeignet (Abb. 4-21).

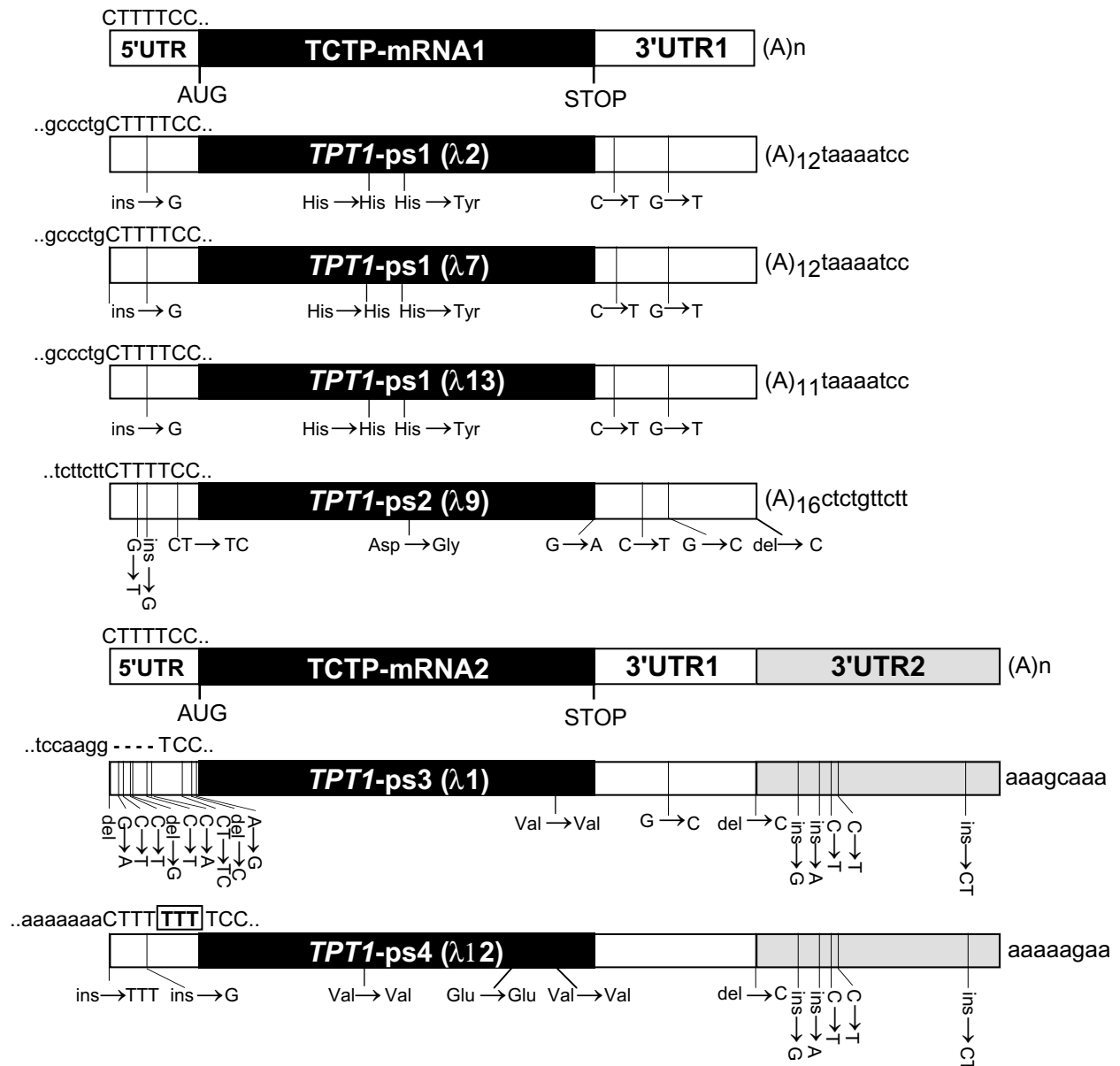


**Abb. 4-21 Subklonierung von genomischen *TPT1*-Pseudogenfragmenten:** Auf dem Bild ist ein *EcoRI* gespaltenen Southernblot von 13 isolierten *TPT1* positiven Lambdaklonen zu sehen ( $\lambda$ 1- $\lambda$ 13). Die mit Pfeil markierten Banden wurden isoliert und in den Vektor pBLSK+ subkloniert.

Von sechs der 13 dargestellten Lambdaklone wurden *EcoRI* Fragmente subkloniert. Damit waren die Voraussetzungen für eine Sequenzierung gegeben.

#### 4.5.2 Sequenzierung und Analyse der Pseudogene

Die sechs subklonierten genomischen *EcoRI* Fragmente, die nach der Restriktionsenzymkartierung TCTP-cDNA ähnliche Sequenzen enthielten, wurden vollständig sequenziert. Die Sequenzen bestätigten alle vorläufige Daten, daß es sich bei den gefundenen Klonen um Pseudogene handelte. Alle untersuchten sechs Pseudogene gehörten zur Gruppe der prozessierten Pseudogene, d.h. sie wiesen die typischen Merkmale wie Sequenzhomologie zum Gen, Intronlosigkeit, kurze Poly(A)-Sequenzen, multiple Mutationen und Zielsequenzduplikationen (ZSD) auf. Die sechs Pseudogene ließen sich auf vier Varianten reduzieren. Unter der Bezeichnungen *TPT1*-ps1, *TPT1*-ps2, *TPT1*-ps3 und *TPT1*-ps4 werden sie in dieser Arbeit und in den EMBL-Datenbankeinträgen AJ131952, AJ131953, AJ131954 und AJ131955 geführt.



**Abb. 4-22 Vergleichende Betrachtung aller sequenzierten TPT1-Pseudogene:** Die Pseudogene λ2, λ7 und λ13 (*TPT1-ps1*) sind bis auf ein zusätzliches, wahrscheinlich artifizielles A in der Poly(A)-Region von Pseudogen λ13, identisch. Zusammen mit Klon λ9 (*TPT1-ps2*) repräsentieren sie Abkömmlinge der kurzen TCTP-mRNA1. Im Gegensatz dazu haben die Pseudogene λ1 (*TPT1-ps3*) und λ12 (*TPT1-ps4*) eine verlängerte 3'UTR2 und spiegeln die Verhältnisse der TCTP-mRNA2 wider. Einige identische Mutationen kommen in verschiedenen Pseudogenen vor, was auf evolutionär getrennte Entwicklungen des Gens und der Pseudogene hindeutet. Die Mutationsrate ist in allen Pseudogenen kleiner als 2% und führt in keinem Fall zu einer Zerstörung des Leserahmens.

Eine graphische Darstellung aller Pseudogene im Vergleich mit den cDNAs sowie die Position der Mutationen zeigt Abb. 4-22. Die Pseudogene der Klone λ2-*Eco*RI, λ7-*Eco*RI und λ13-*Eco*RI stellten sich als nahezu identisch heraus (siehe Legende zu Abb. 4-22), wie auch schon durch die homologen Southernblot-Muster zu vermuten gewesen war. Bei den Klonen λ1-*Eco*RI und λ12-*Eco*RI handelte es offenbar um Abkömmlinge der langen TCTP-mRNA2, wie aus der

Existenz von 3'UTR2 Sequenzen ersichtlich wurde. Alle anderen Klone stammten von der kurzen mRNA-Variante ab. Unabhängige Untersuchungen der nicht weiter subklonierten Pseudogenklone durch PCR ergaben, daß auch sie den kurzen Messenger repräsentierten. Geht man davon aus, daß Pseudogene die zytoplasmatischen Konzentrationen der vorhandenen mRNAs widerspiegeln, so findet diese Annahme im Falle der TCTP-Messenger seine Bestätigung in dem Verhältnis der kurzen zu den langen Pseudogenen - im konkreten Fall ca. 10:1. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Northernblots, die ähnliche Verhältnisse in vivo zeigen.

Eine Besonderheit aller sequenzierten Pseudogene lag in der Intaktheit des Leserahmens und der insgesamt hohen Homologie zur cDNA von über 98%. Die große Mehrheit aller in der Literatur beschriebenen Pseudogene ist durch weitaus zahlreichere Mutationen gekennzeichnet. Diese zerstören in der Regel den Leserahmen oder führen zu schwerwiegenden Aminosäureaustauschen in der kodierenden Region. Daß dies in den untersuchten *TPT1*-Pseudogenen nicht der Fall war führte zu der Diskussion, ob die Pseudogene unter funktionellem Erhaltungsdruck standen (Kap. 4.5.3).

Ebenfalls interessant ist die Tatsache, daß einige identische Mutationen bei verschiedenen Pseudogenen gefunden wurden. Dazu zählt die G-Insertion an Position 51 der homologen cDNA. Sie findet sich bei dem Pseudogen *TPT1*-ps1 (stellvertretend für die Klone  $\lambda$ 2,  $\lambda$ 7 und  $\lambda$ 13), *TPT1*-ps2 und *TPT1*-ps4. Das Pseudogen *TPT1*-ps3 hat an der gleichen Stelle eine andere Mutation. Ähnlich sieht es mit dem Austausch G nach C an der Position 734 der mRNA aus, die in allen Pseudogenen, außer *TPT1*-ps4, vorkommt. Die Pseudogene *TPT1*-ps3 und *TPT1*-ps4 teilen sich wiederum eine Reihe gemeinsamer Mutationen, die sich vor allem in der 3'UTR2 Sequenz häufen.

### 4.5.3 Untersuchung der flankierenden Bereiche der Pseudogene

Im Kapitel 2.4 wurde besprochen, auf welchem Wege es zur Bildung von prozessierten Pseudogenen kommen könnte. Ein gemeinsames Merkmal aller Modelle ist eine Erklärung für die 5-20 bp lange Sequenz, die sich unmittelbar stromauf- und stromabwärts des Pseudogens dupliziert. Man vermutet, daß der Mechanismus des Einbaues zu dieser sogenannten Zielsequenzduplikation (ZSD) führt. Um dieses Merkmal auch bei den TCTP-Pseudogenen nachzuweisen, wurden die flankierenden Bereich sequenziert (Tabelle 5).

Wie die Tabelle zeigt, haben alle untersuchten Pseudogene als ZSD anzusprechende Elemente in den flankierenden Bereichen. Die beiden Pseudogene *TPT1*-ps1 und *TPT1*-ps2 haben vollständig der Regel entsprechende Duplikaturen von 16 bzw 10 Nukleotiden, wobei in der ZSD für ps1 eine Mutation vorkommt. Das Pseudogen *TPT1*-ps3 hat insofern keine typische ZSD, da sich unmittelbar im Anschluß an die 5'UTR keine derartige Sequenz findet, jedoch ist ein Äquivalent circa 100 bp stromaufwärts (gaaattat) vorhanden. Da auch der Anfang der Pseudogensequenz fehlt, könnte eine Insertionssmutation die Verschiebung erklären. Das Pseudogen *TPT1*-ps4 ist auch kein typischer Vertreter für ZSD. Auffällig ist aber die sowohl 5'UTR- als auch 3'UTR-seitig anzutreffende Sequenz des Typs  $(g(a)_n)_n$ . Sie ließe sich durchaus als ZSD interpretieren, auch wenn die genauen Dimensionen nicht anzugeben sind. Die Tatsache, daß die Base Adenin 5'UTR-seitig des Motivs  $(g(a)_n)_n$  4 mal wiederholt wird, 3'UTR-seitig jedoch 5 mal, ist schwer erklärbar. Möglicherweise spielen nachträgliche Mutationen hierbei eine Rolle.

Pseudogene	5' flankierende Region	3' flankierende Region
<i>TPT1</i> -ps1	...attt <u>aaaaatccatagccct</u> gCTTTT---CCG...	...AAATTC(a) <sub>12</sub> <u>taaaatccatagccct</u> ttt...
<i>TPT1</i> -ps2	...aaactctcttcttCTTTT---CCG...	...AAATT-(a) <sub>16</sub> <u>ctctgttctt</u> ttta...
<i>TPT1</i> -ps3	...aatgaaattatcca(n) <sub>91</sub> aaa.....CCG...	...GAGTTGaaagc(a) <sub>28</sub> gaagaagaattattata..
<i>TPT1</i> -ps4	...g(a) <sub>4</sub> g(a) <sub>4</sub> g(a) <sub>4</sub> g(a) <sub>7</sub> CTTTTTCG...	...TTGAGTTG(a) <sub>5</sub> g(a) <sub>5</sub> g(a) <sub>5</sub> g(a) <sub>5</sub> g...

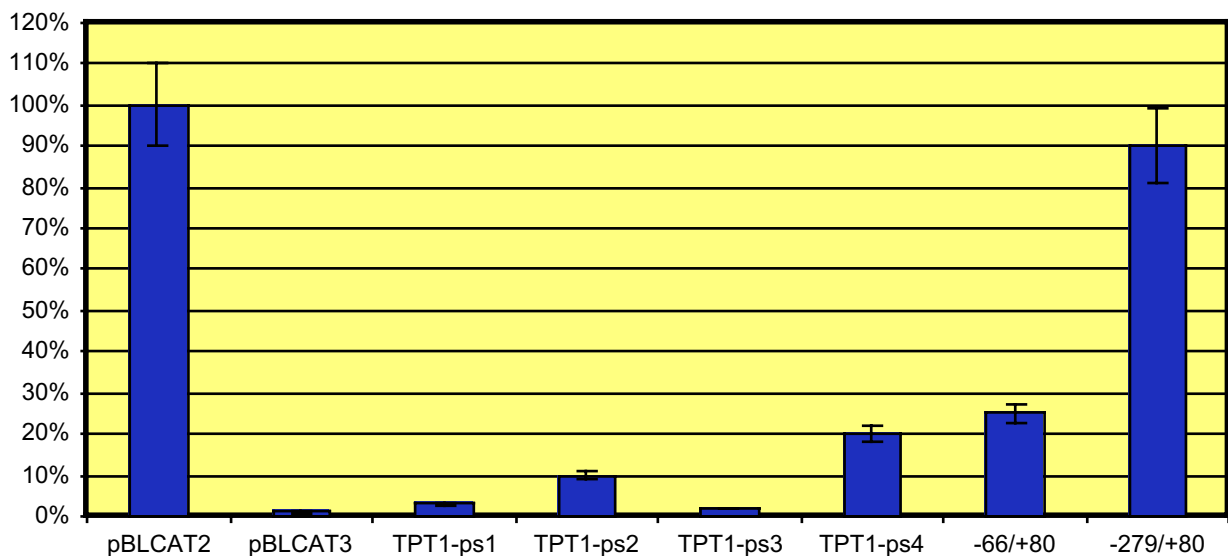
**Tabelle 5 Zielsequenzduplikationen in den flankierenden Bereichen von vier *TPT1*-Pseudogenen.**

### 4.5.4 Promotoraktivität der 5'-flankierenden Regionen der Pseudogene

Der Grund dafür, daß die stromaufwärts der Pseudogene gelegenen Sequenzen auf Promotoraktivitäten untersucht wurden, liegt in der Intaktheit des Leserahmens aller untersuchten Pseudogene und der damit verbundenen prinzipiellen Möglichkeit ihrer

Exprimierbarkeit bis hin zum funktionellen Protein. Beispiele hochkonservierter prozessierter Pseudogene sind in der Literatur sehr selten (**Dahia et al. 1998**). Normalerweise mutieren nichtfunktionelle Pseudogene schnell weiter. Die Tatsache, daß beim Kaninchen Pseudogene gefunden wurden, die für authentisches TCTP kodieren, läßt sich entweder so erklären, daß sie evolutionär sehr jungen Ursprungs sind und ihren intakten Leserahmen noch nicht verändert haben, oder daß sie unter funktionellem Erhaltungsdruck stehen. Für die Transkription ist ein Promotor nötig. Die Inspektion der 5'-flankierenden Bereiche ließ jedoch keine klassischen Promotorelemente erkennen. Trotzdem wurde der Versuch unternommen, in Konstrukten mit dem *cat*-Reporter gen dort potentielle Promotoraktivitäten nachzuweisen.

Der Aufbau der Experimente, die Subklonierung von Promotorfragmenten, Zelltransfektion und anschließende Testung in CAT-Assays war analog zu denen im Kap. 4.3 beschrieben. Die Abb. 4-23 zeigt das Ergebnis.



**Abb. 4-23 Promotoraktivität der 5' flankierenden Bereiche ausgewählter *TPT1*-Pseudogene:** Der Vektor pBLCAT2 ist die Positivkontrolle und pBLCAT3 die Negativkontrolle. Neben der Promotoraktivität der vier Pseudogene *TPT1*-ps1/2/3/4 sind die CAT-Aktivitäten des minimalen *TPT1*-Promotormotivs (Fragment -66/+80) und des Fragments mit maximaler *TPT1*-Promotoraktivität (Fragment -279/+80) gegenübergestellt.

Während die Promotoraktivität der Pseudogene *TPT1*-ps1 und *TPT1*-ps3 im Bereich der Negativkontrolle lagen, hatten die 5' flankierenden Bereiche der Pseudogene *TPT1*-ps2 und *TPT1*-ps4 eine deutliche Promotoraktivität, wie sie vergleichbar mit der Minimalaktivität des Promotors des *TPT1*-Gens war. Anscheinend führten Verstärkersequenzen in der Umgebung der



Pseudogene zu einer Transkriptionsstärke von 15-20% des viralen Promotors. Eine Analyse der verfügbaren 120 bp *TPT1*-ps4 Promotorsequenzen erbrachte keine Anhaltspunkte für das Vorliegen typischer Promotorelemente, wie einer TATA-Box oder Bindungsstelle mit hoher Homologie für spezielle TF, sondern zeigte Eigenschaften von Mikrosatelliten und Poly-A-reichen bzw. AT-reichen Abschnitten. Da der in CAT-Assays untersuchte Promotorbereich von *TPT1*-ps4 jedoch 1,2 kb umfaßte, könnten Enhancer jenseits der 120 bp Grenze für die beobachtete Promotoraktivität verantwortlich sein.

## 5 Diskussion

### 5.1 Ein Vergleich der *TPT1*-Gene von Mensch und Kaninchen

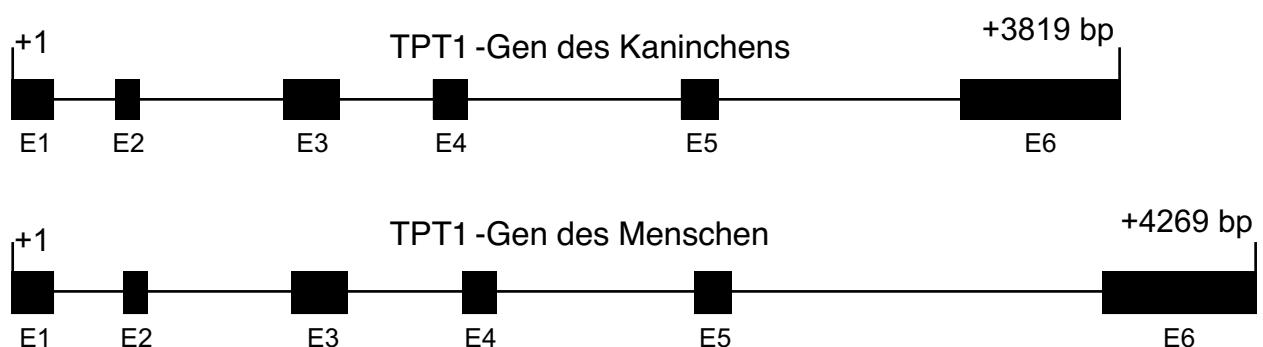
Ein typisches Säugetiergen hat die Länge von 1-100 kb und kodiert für eine Polypeptidkette von 100-1000 Aminosäuren. Die Grenzbereiche der Größenskala schließen kleine intronlose Gene, wie die der Histone, und mehr als 2 Mb große Gene, wie das Dystrophingen mit über 500 Introns, ein.

Das *TPT1*-Gen des Kaninchens, dessen Struktur und Sequenz in dieser Arbeit erstmals vorgestellt wurde, präsentierte sich mit 3819 bp als eher kleiner, aber durchschnittlicher Vertreter eines Säugergens. Das Gen enthält 6 Exons (144 bp, 74 bp, 191 bp, 106 bp, 117 bp, 531 bp), die durch 5 Introns (220 bp, 503 bp, 331 bp, 746 bp, 856 bp) unterbrochen werden (Abb. 4-11, S. 48). Alle Exon/Intron-Übergänge gehorchen der gt/ag Regel - ein Charakteristikum der Mehrzahl aller gefundenen Gene. Die 5' untranslatierte Region des Gens ist 116 bp lang. Das letzte Exon enthält zwei alternativ benutzte Polyadenylierungssignale. Dies erklärt die beobachteten mRNA-Varianten (TCTP-mRNA1 und TCTP-mRNA2) von 843 nt und 1163 nt, die sich in der Länge der 3' untranslatierten Region unterscheiden. Bisher konnte noch kein funktioneller Zusammenhang zur Bedeutung der alternativen Transkripte gefunden werden.

Die Genkontrollregion und Teile des ersten Exons sind in eine CpG Insel eingebettet (Abb. 4-19, S. 58). Die Entstehung von CpG-Inseln in der Umgebung der Genkontrollregionen wird auf einen besonderen Inaktivierungsmodus ausgewählter Chromatinabschnitte zurückgeführt. Auslöser für die reversible Stillegung von Teilen der chromosomalen DNA ist die Methylierung von CG-Sequenzen. Werden methylierte C-Nukleotide desaminiert, kommt es infolge ineffektiver Reperaturen zum Verlust der CG-Sequenz, die zu TG mutiert. Unmethylierte DNA-Abschnitte, wie die Genkontrollregionen, bleiben von diesen Veränderungen verschont und als CG-reiche Insel erhalten (siehe Kap. 4.3.4). Der Nachweis der CpG-Insel im Bereich des Promotors des *TPT1*-Gens ist als Hinweis für eine transkriptionelle Aktivität des Gens zu bewerten. Obwohl man CpG-Inseln bevorzugt bei Haushaltsgenen findet, spricht deren Vorkommen bei einigen gewebsspezifischen Genen gegen die automatische Annahme, es handle sich um ein Haushaltsgen. Das *TPT1*-Gen nimmt in dieser Hinsicht eine Zwischenstellung ein,

da die Transkription in allen untersuchten Geweben stattfindet, aber durch gewebsspezifische Faktoren quantitativ mitreguliert wird und auf mitogene Stimuli reagiert.

Die vollständige Aufklärung der Struktur des Human-*TPT1*-Gens machte den direkten Vergleich von Human- und Kaninchengen möglich. Die Veröffentlichung einer Teilstruktur des Humangens lieferte die Daten über die Exon/Intronarchitektur, die Struktur der 3'UTR2 und die Sequenz des Introns 3 (**Bonaldo et al. 1996**). Durch die in dieser Arbeit beschriebene Klonierung und vollständige Sequenzanalyse der restlichen Teile des Humangens wurden 500 bp Promotorsequenzen, das vollständige Exon 1 und die bisher unbekannten intronischen Sequenzen aufgeklärt. Das Human-*TPT1*-Gen ist nach vorläufigen Sequenzdaten 4269 bp groß. Seine Struktur ist identisch mit der des Kaninchengens. Zu den konservierten Strukturen gehören die Exon/Intronübergänge, die CpG-Insel sowie die besonderen Merkmale des Exons 6. Dieses enthält analog zum Kaninchengen die verlängerte 3'UTR2. Die Abb. 5-1 stellt das Kaninchengen dem humanen gegenüber. Tabelle 6 listet die Größen aller Exons und Introns und deren Homologien untereinander auf.



**Abb. 5-1 Vergleich zwischen dem *TPT1*-Gen des Kaninchens und des Menschen**

	E1	I1	E2	I2	E3	I3	E4	I4	E5	I5	E6
<b>Kaninchen</b>	144	220	74	503	191	331	106	746	117	856	531
<b>Mensch</b>	142	255	74	525	191	391	106	721	117	1220	517
<b>Homologie</b>	86%	64%	98%	73%	94%	48%	98%	52%	95%	46%	85%

**Tabelle 6 Größen der Exons (E) und Introns (I) der *TPT1*-Gene des Kaninchens und des Menschen (in bp) und ihre Homologien untereinander**

Die Analyse beider Gene zeigt, daß alle Exon- und Intronübergänge konserviert sind. Die Exons 2, 3, 4 und 5 zeigen keine Längendifferenzen. Ihre Homologien liegen zwischen 94% und 98%.

Die Abweichungen des ersten und letzten Exons, deren Homologien bei etwa 85% liegen, sind zum größten Teil auf die UTRs zurückzuführen. Auf Aminosäureniveau beträgt die Sequenzhomologie 98,3%. Erwartungsgemäß weichen die Introns sehr viel stärker voneinander ab. Ihre Übereinstimmung erreicht Werte bis 73% im zweiten Intron. Das humane Intron 5 ist 364 bp länger und stimmt nur zu 46% mit dem Kaninchenintron überein. Dies geht unter anderem auf mehrere Insertionen, die größte etwa 200 bp, zurück.

## **5.2 Die Transkriptionsregulation des *TPT1*-Gens**

### **5.2.1 Auswertung der *CAT*-Assays und Analyse der Promotorsequenzen**

Das eigentliche Anliegen dieser Arbeit war, Aussagen zur Kontrolle des *TPT1*-Gens zu treffen. Voraussetzung dafür war die Klonierung und vollständige Strukturaufklärung des *TPT1*-Gens, einschließlich der Klonierung des *TPT1*-Promotors, dem 5' flankierenden Genbereich, welcher die Kontrolle des Gens auf transkriptioneller Ebene vermittelt. Aus diesen Bemühungen ging die erste vollständige *TPT1*-Gensequenz eines eukaryontischen Organismus, im konkreten Fall die des Kaninchens, hervor. Etwa 1,2 kb der Promotorsequenz wurden vollständig sequenziert und standen für weitere Analysen zur Verfügung. Parallel dazu gelang später die Subklonierung des humanen *TPT1*-Gens. Von diesem Gen wurden bislang nur Teile veröffentlicht. Zwar gingen die Intron/Exonübergänge daraus hervor, jedoch fehlten die meisten Introns, Teile des Exons 1 sowie der Promotor. Indem etwa 500 bp des humanen Promotors sequenziert werden konnten, waren erstmals Einblicke in mögliche regulatorische Charakteristika des humanen *TPT1*-Gens und Vergleiche zum Kaninchen Promotor möglich.

Als nächstes sollte die Fragestellung untersucht werden, ob es sich im vorliegenden Fall um die authentischen aktiv transkribierten *TPT1*-Gene handelte und im positiven Falle die Stärke des Promotors ermittelt werden. Bekannterweise existieren von einer Vielzahl von Genen Pseudogene vom unprozessierten Typ. Diese besitzen alle Merkmale von Genen mit Exons, Introns und Promotorstrukturen, sind jedoch durch verschiedenste Mutationen ausgeschaltet worden. Die Computeranalyse des Kaninchengens konnte die Intron- und Exonorganisation eindeutig zuordnen und zeigen, daß keine Mutationen im kodierenden Bereich sowie der wichtigen Spleißkonsensusorte vorlagen. Der Promotor wies ferner eine TATA-Box an der Konsensus-Position -29 auf, was genau mit den beobachteten mRNA-Größen übereinstimmte.

Dieses Element wird vom TBF erkannt und ermöglicht den Aufbau des PolymeraseII-Multienzymkomplexes. Trotzdem hätten Mutationen im Promotorbereich eine Inaktivierung des Gens bewirken können. Deshalb wurden CAT-Assays mit Teilen des Kaninchenpromotors durchgeführt, um Aussagen über die Funktionalität und Stärke des Promotors zu erhalten.

Dazu wurde der Promotor in 5 unterschiedlich große Fragmente (-66/+80, -166/+80, -291/+80, -379/+80, -918/+80) zerlegt und in einen CAT-Reportervektor umkloniert. Diese Konstrukte wurden anschließend in glatte Muskelzellen des Kaninchens transfiziert und die Promotorstärke, die proportional zur gemessenen CAT-Aktivität ist, gemessen. Die Ergebnisse (Abb. 4-18, S. 57) zeigten eine starke Aktivität des Fragmentes -291/+80 von 90% des viralen (HSV1-Virus) Vergleichspromotors. Die kleineren Fragmente hatten Aktivitäten von 20-25%, während die größeren Fragmente leicht an Aktivität (80-85%) einbüßten. Das Fragment -291/+80 war jenes mit der höchsten Aktivität. Ob es sich hierbei um die maximale Aktivität des *TPT1*-Promotors handelt, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden, da Konstrukte jenseits der -918 bp-Grenze nicht kloniert und somit nicht getestet wurden. Der Abfall der Aktivität bei den Fragmenten größer als -291 bp könnte auch als Indiz für stromaufwärts gelegene Silencer-Sequenzen gedeutet werden, obwohl der Meßfehler von etwa 10% diese Aussage nicht mit Absolutheit zuläßt.

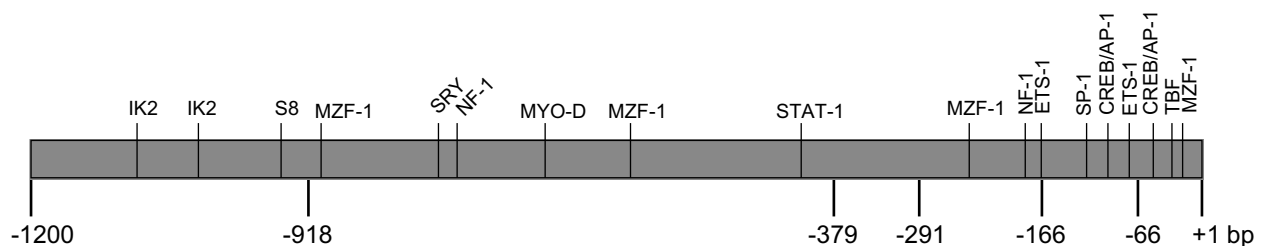
Eine interessante Aussage ließ sich durch parallel durchgeführte Transfektionsexperimente des größten Konstruktes -918/+80 mit einer humanen Blutzelllinie (K562-Zellen) erzielen, in der sich ebenfalls eine deutliche Aktivität zeigte. Die Tatsache, daß ein Kaninchenpromotor auch in humanen Zellen aktiv ist, deutete auf eine starke Konservierung der beteiligten cis/trans Elemente hin. Vor diesem Hintergrund war die Analyse des humanen *TPT1*-Promotors eine wichtige Zielstellung. Die Sequenzierung des humanen Promotors zeigte dann auch erwartungsgemäß eine ausgeprägte Sequenzhomologie, besonders der ersten 160 bp.

Die weiteren Analysen des Human- und des Kaninchenpromotors stützten sich im wesentlichen auf die Suche nach potentiell bindenden TF und dem Sequenzvergleich zwischen dem Human- und dem Kaninchenpromotor. Das Auffinden bekannter TF wurde mit Hilfe des Programms MatInspector® realisiert (Quandt et al. 1995). Dieses Programm stützt seine Auswertung auf

eine Datenbank mit gespeicherten TF und deren Bindungssequenzen und -motiven. Indem man Programmversionen benutzt, die auf Internetressourcen als Datenbankquelle zurückgreifen, kann man effektiv das Potential der ständig aktualisierten TF-Datenbanken (z.B. TransFac®) auf frei zugänglichen Netzwerkservers nutzen (<http://transfac.gbf.de>).

Das Ergebnis dieser Analysen besteht aus einer Liste von möglicherweise bindenden TF. In der Gensequenz der Abb. 4-12 (S. 51) wird eine Auswahl dieser Faktoren und ihre hypothetischen Bindungsorte am *TPT1*-Promotor des Kaninchens dargestellt.

Berücksichtigt wurden nur Faktoren mit 100 % Kernsequenzhomologie. Damit ist ein etwa 4 bp langer Sequenzbereich innerhalb der Bindungsregion gemeint, der nur in seltenen Fällen eine Abweichung zeigte. Die angrenzenden Bereiche (Matrix) können dagegen kleine Abweichungen haben. Diese Schwelle der Übereinstimmung wurde auf 95% Homologie festgelegt. Durch Veränderung der Schwelle nach unten ist es möglich, erheblich mehr Bindungsregionen für Faktoren vorherzusagen, weshalb die Grenze bewußt so gewählt wurde, daß mit einer überschaubaren Anzahl von TF weitergearbeitet werden konnte. Dieses Vorgehen ist gerechtfertigt, da die Erfahrungen unserer und anderer Gruppen zeigen, daß TF in der Regel nur an hochhomologe Konsensussequenzen binden. Abb. 5-2 gibt die Lage der Faktoren am Kaninchenpromotor graphisch-maßstabsgerecht wider.



**Abb. 5-2 Position einiger möglicher TF am Kaninchen *TPT1*-Promotor:** Die Positionsmarkierungen (in bp) entsprechen den in den CAT-Experimenten verwendeten Promotorfragmenten.

Berücksichtigt man die Ergebnisse der CAT-Assays, ergibt sich folgendes Bild. Im kleinsten Fragment (-66/+80) binden zwei Faktoren - MZF-1 (Pos. -22) und die Mitglieder der CREB/AP-1-Familie (ab Pos. -52). Die Promotoraktivität dieses Fragmentes entspricht etwa 20% des zum Standard erhobenen viralen Promotors. Das nächst längere Fragment (-166/+80) weist einen weiteren Bindungsort für die CREB/AP-1-Familie (ab Pos. -94) sowie zwei ETS-1 Orte (Pos. -76, -163) und einen SP-1 Ort (Pos. -121) auf, hat aber eine etwa vergleichbare Aktivität, so daß

sich die Minimalaktivität des Promotors auf die beiden erstgenannten Faktoren des -66/+80-Fragmentes konzentrieren läßt. Einen deutlichen Anstieg der Aktivität (90%) verzeichnet das Fragment -291/+80. Zwei Faktoren kommen als Bindungspartner in Frage- NF-1 (Position -182) und MZF-1 (Position -242). In den nächst längeren Fragmenten kommen mögliche Bindungsstellen für die Faktoren MZF-1, STAT-1, MYO-D, NF-1, SRY, S8 und IK2 vor. Da alle Konstrukte Teile der 5'UTR enthielten (80 bp), wurde auch dieser Bereich auf Bindungsstellen analysiert. Dabei stellten sich zwei weitere Bindungsstellen für MZF-1 und NF-1 dar.

### **5.2.2 Vergleich der *TPT1*-Promotoren von Mensch und Kaninchen**

Die Klonierung des Human-*TPT1*-Promotors eröffnete die Möglichkeit, weiterreichende Aussagen über die Wahrscheinlichkeit zu treffen, ob ein TF tatsächlich in die Kontrolle des Gens involviert sein könnte. Dies beruht auf der Tatsache, daß TF als trans-Faktoren und DNA-Bindungsstelle als cis-Faktoren evolutionär stark konserviert wurden. Die Bedeutung des TCTP für eukaryontische Organismen scheint auf Grund der weiten Verbreitung in allen untersuchten Organismen und der hohen Konserviertheit des Proteins gegeben zu sein. Deswegen würde man erwarten, daß sich cis-Elemente im *TPT1*-Gensequenzvergleich verschiedener Organismen durch gesteigerte Homologien zu erkennen geben. Die folgende Abbildung (Abb. 5-3) zeigt den Vergleich des Human- mit dem Kaninchenpromotor.

-430	CAAGCACCCAGACGGCGCTGGGTCGCCTCCAGGGTCAGAGCCCCTCTTCCGTAAACGCAGGTCCCTCC	Kaninchen
-447	CCCCAGGCCAGAGGGC-CTGA-----CCCTCCTAAATGCGACGTTCT-CCTACC	Mensch
-371	CTCTGTAGACATGTTTCGCTCCCAGAAAGGGAG-----GGAACCTGGGTGGGGCGAAGCTTGA	Kaninchen
-377	CTTGTTGATACTCAGCTTCCCAGAAAGGGTGGAACCTAGGCTGGACGAGGCGCAGGGCCAAAGTTTAA	Mensch
	STAT-1 TST-1	
-319	CGAGAGTTCACGTAAGCTGCCCCAG-----GCCGCCCGCAGGGCAGGGTAGGGAG	Kaninchen
-318	-----TTCCTCTAAGCTCCACCCAGCTCCACGACCTCTCCAGGCGCCCGTGGGGTAGGGCG-----	Mensch
	CP-2	
-267	GCGCAGAGCC-----CTCA-CTTCTCCACTCT-----CCCTAGCCGAGGGCGGAAGACCGCT	Kaninchen
-259	-----GAGCCGGGTCAAACGTACTCGCTTCCCCGCTCCACCCACCC-----AGGGCTAGGGAGCGCC	Mensch
	MZF-1	
-208	CATAGAGCCCCCGCCAACC CGCCCC TCCCCATC C-----CGCACACTCCCCGCTCCAGCCCTC-----	Kaninchen
-198	CGAGAGTTG--GCCTCCC-----TCCCCACTGGGGGCGCACC TCCCCGCC-CCCAACCCTACCCGCTG	Mensch
	NF-1 MZF-1 MZF-1	
-140	GCGTACCCGCCGAACACAGACGGCATCGCGG--CTCCCAGCCAAGTACCCGGATGTCGCGTTTGTCGCG	Kaninchen
-140	GCGTACCCAGTGGA-----ACGGAGCCTTGTGTCTCCGCCTCAAGTCCCGGATGCTCACCT-----C	Mensch
	NF-1 ETS-1	
-70	CCCCGAC CAGGCCTAGCCGTGGCCCCGCCCCCGCGCCGCTCTGCGTGCCACGTCACTGCTTGCGGCGCTTC	Kaninchen
-70	CCCCGACTCGCCCCCGCTGTGGCCCCGCCCCCGCGCGGCTCTCTGTCGACGTCAACGCTGCGTTCGCTTC	Mensch
	MZF-1 SP-1 CREB/AP-1 ETS-1	
-1	CGGGA GCGCAGCGGACGATGACGTAG AAGGACGTGCCCTCTATATGAGGTTGGGGA GCGGCTGAGTCGGC	Kaninchen
-1	CGGAG GCGCAGCGGCGATGACGTCA GGGACGTGCCCTCTATATGAGGTTGGGGA GCGGCTGAGTCGGC	Mensch
	CREB/AP-1 TBF MZF-1	

**Abb. 5-3 Vergleich der *TPT1*-Promotoren des Kaninchens und des Menschen:** Übereinstimmende Basen wurden blau markiert. Potentielle TF-Bindungsstellen sind zusätzlich gelb hervorgehoben.

Beachtenswert ist die starke Homologie der ersten 160 bp, die 89% beträgt. Danach fällt sie rasch auf niedrigere Werte ab. Alle Faktoren, die sich in diesem Abschnitt finden, sind hochkonserviert. Dazu gehören CREB/AP-1 (-52, -94), ETS-1 (-76, -163), MZF-1 (-22) und SP-1 (-121). Danach zeigt sich, daß einige Bindungsstellen kaum Homologie zueinander haben, z.B. NF-1 (-182) und TST-1 (-385). Wiederum konserviert scheinen die Bindungsstellen für die Faktoren MZF-1 (-242) und STAT-1 (-413) zu sein. Im folgenden sollen diese konservierten Faktoren besprochen werden.

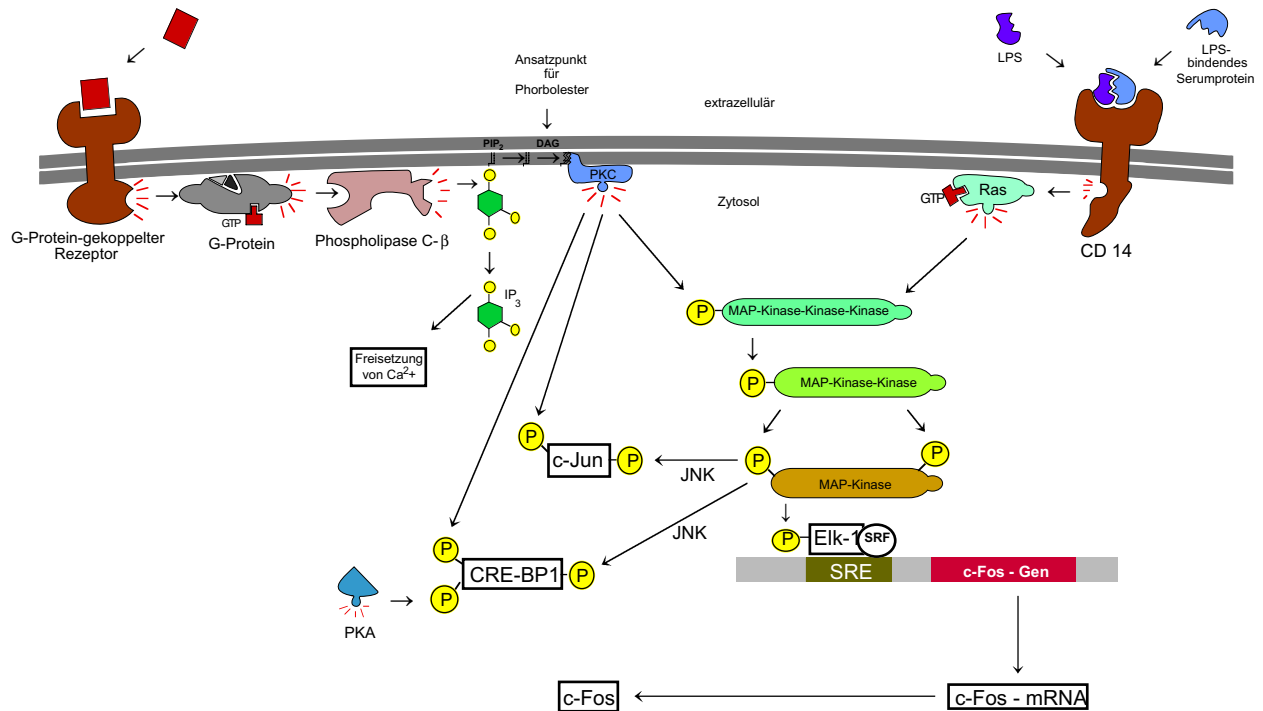
### 5.2.3 *TPT1*-Induktoren

Im Kapitel Einleitung wurde schon darauf hingewiesen, daß das Wissen um die transkriptionelle Regulation des *TPT1*-Gens nur sehr unzureichend war. Seit der Erstbeschreibung des Proteins gab es jedoch zunehmend Hinweise auf eine Reihe von Induktoren der TCTP-Synthese, von



denen man zum Teil den Wirkmechanismus kennt. Zu den bekannten *TPT1*-Genaktivatoren gehören DMSO, TPA, LPS, einige Schwermetalle und IL-3. Es lag also auf der Hand, nach Hinweisen zu suchen, die diese Induktoren in Verbindung mit TF brachten.

Interessanterweise gibt es Zusammenhänge, die die meisten, der beobachteten Induktionsphänomene, auf gemeinsame Mechanismen reduziert. Die Tatsache, daß TPA zu diesen Induktoren zählt, ist in diesem Zusammenhang erwähnenswert. Phorbolester sind schon lange als Tumorpromotoren bekannt. Dieser Reizstoff aus den Blättern der Crotonpflanze greift in einen zentralen Regulationspunkt der Zellwachstumssteuerung ein, indem es die Proteinkinase C (PKC) aktiviert (**Varmus und Weinberg 1994**), von der bekannt ist, daß sie auch durch IL-3 stimuliert wird (**Mufson et al. 1992**). Die PKC gehört zu den Schlüsselkomponenten einer Signalkaskade, die als Reaktion der Zelle auf extrazelluläre Stimuli aktiviert wird. Die Reaktionskaskade geht über die Aktivierung bestimmter Rezeptoren → G-Proteine → aktivierter Phospholipase C und Spaltung von  $\text{PIP}_3$  in  $\text{IP}_3$  und DIG. TPA ahmt die Wirkung von DIG nach, indem es genau wie dieses zur Aktivierung der PKC führt (**Alberts et al. 1995**). Die Wirkungen dieser Kinase sind mannigfaltig. In vielen Zellen führt sie zu einem Anstieg der Transkription spezifischer Gene, indem sie direkt Transkriptionsfaktoren phosphoryliert (z.B. c-JUN und CRE-BP1) und dadurch aktiviert oder andere Kinasen aktiviert. Dazu gehören die MAP-Kinasen (auch als ERKs bezeichnet), von deren Familie mindestens fünf verschiedene Vertreter bekannt sind (JNK/SAPK, ERK1, ERK2, p38, p42) und die ebenfalls in der Lage sind, TF zu aktivieren. Zu den TF, die von der PKC und den MAP-Kinasen phosphoryliert werden, gehören Elk-1 als Teil des SRE (serum response element), I $\kappa$ -B als spezifischer Inhibitor des Faktors NF- $\kappa$ B und c-Jun als Teil des Faktors AP-1. Da sich im Promotor des *TPT1*-Gens zwei Bindungsorte für die CREB/AP-1-Familien befinden, scheint hier eine mögliche Verbindung zwischen der PKC-Aktivierung einerseits und Aktivierung der TCTP-Synthese andererseits zu bestehen. Die MAP-Kinase ist selbst Substrat anderer Kinasen, der MAP-Kinase-Kinase und diese wiederum Substrat von MAP-Kinase-Kinase-Kinasen. Dazu gehört z.B. Raf als Teil eines Rezeptor-Tyrosinkinase-Signalweges, der über eine ras-gekoppelte Aktion ebenfalls die MAP-Kinasen aktiviert. Folgende Abbildung (Abb. 5-4) veranschaulicht dies graphisch.



**Abb. 5-4 PKC und MAP-Kinase abhängige Signaltransduktionsprozesse** (aus Alberts et al. 1995)

Lipopolysaccharide (LPS) sind ebenfalls als Aktivatoren der TCTP-Synthese bekannt. Man weiß, daß LPS an einem bestimmten Serumprotein bindet (LPS bindendes Protein) und mit dem Oberflächenrezeptor CD14 interagiert. Die von hier ausgehenden Signaltransduktionsprozesse führen zur Aktivierung verschiedener MAP-Kinase-Familien, wie p42, p44, ERK1, ERK2, p38 und JNK/SAPK (**Hambleton et al. 1995**, **Swantek et al. 1997**). Da Mitglieder der MAP-Kinasen TF, wie AP-1 und einige CREB-Faktoren, phosphorylieren, ist eine Aktivierung des *TPT1*-Gens auf diesem Wege erklärbar.

Eine andere Möglichkeit der TCTP-Akkumulation wurde beim Regenwurm beschrieben (**Sturzenbaum et al. 1998**). Hier war die Synthese als Reaktion auf schwermetallbelastete Böden erhöht. Besonders Kupfer, aber auch Cadmium und Blei, führten hier zu Induktionsphänomenen. Für Kupfer als essentielles Spurenelement sind spezifische Regulationsmechanismen bekannt. In den Promotoren einiger Gene (**Winge 1998**) befinden sich kupferresponsibile Elemente, die mit spezifischen, kupferbindenden TF interagieren (z.B. ACE-1, AMT-1, MAC-1, MTF-1). Im *TPT1*-Promotor des Kaninchens kommen jedoch keine derartigen Bindungsmotive vor. Da eine Reihe verschiedener Schwermetalle zu einer Induktion des TCTP führen, kann man vermuten, daß es sich hierbei um eine zelltoxische Stimuli

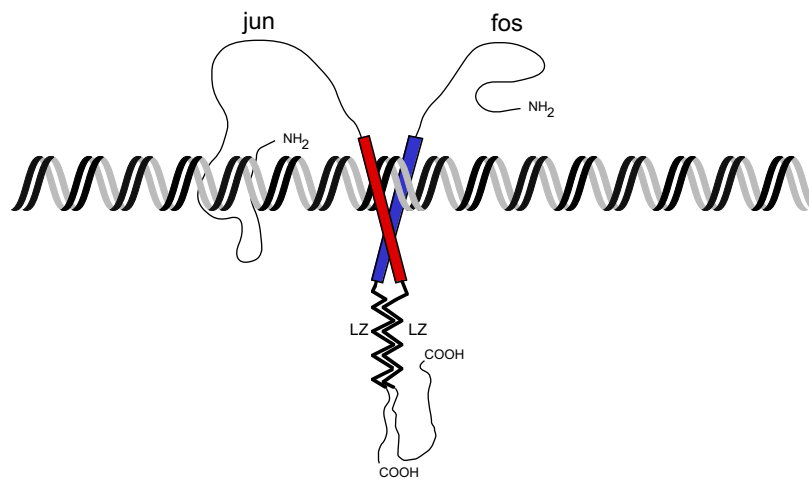
subsummierende Zellreaktion handelt. Zu den Ereignissen, die als Antwort auf Schwermetallbelastungen beschrieben wurden, zählt z.B. auch ein Anstieg des intrazytoplasmatischen Redoxpotentials (**Hultberg et al. 1997**). Da auf der anderen Seite Radikale als direkte und indirekte Aktivatoren der PKC gelten (**Whisler et al. 1994, Kuo et al. 1995**), scheint die TCTP-Syntheseerhöhung auf diesem Wege erklärbar zu sein. Dem stehen die Beobachtungen konzentrationsabhängiger hemmender und stimulierender Effekte von Schwermetallen auf die Aktivität der PKC anderer Autoren gegenüber (**Speizer et al. 1989, Rajanna et al. 1995**). Die Tatsache, daß Schwermetalle zu einer spezifischen Anschaltung einer Reihe von TPA-induzierbarer Gene trotz PKC-Hemmung führen (**Epner und Herschmann 1991**), macht auch andere Induktionsprinzipien wahrscheinlich, wie die Involvierung der p60SRC Tyrosinkinase (**Lee et al. 1996**).

DMSO war der erste gefundene *TPT1*-Aktivator, doch sind seine breit gefächerten Effekte auf Zellen sind bis heute nicht restlos verstanden. Neben den Eigenschaften als Lösungsmittel, Zytoprotektor, Biomenbranen-Permeator, Radikalfänger und Zellfusogen, die auf besondere chemische Eigenschaften dieser Verbindung zurückgehen, steht seine Fähigkeit, die Zelldifferenzierung verschiedener Gewebearten zu aktivieren im Vordergrund des Interesses (**Yu und Quinn 1994**). Diese wird auf der Ebene der Genaktivierung vermutet und vieles spricht dafür, daß dies auf eine Aktivierung intrazellulärer, "second messenger" gekoppelter Signalkaskaden zurückgeht. Dafür sprechen z.B. die synergistische Wirkung von PMA und DMSO bei der Apoptose, die mit einer Langzeit-PKC-Aktivierung einhergeht (**Trubiani et al. 1998**), die Tatsache, daß die DMSO-induzierte Differenzierung von Human-Erythroleukämiezellen von einer Erhöhung der PKC-Aktivität begleitet ist (**Durkin et al. 1992**) oder die DMSO-gekoppelte Aktivierung des HIV-1 LTR, welche synergistisch zu den Induktoren PMA, TNF- $\alpha$  und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirkt (**Klebanoff et al. 1997**).

### **5.2.4 Beschreibung der potentiell bindenden TF**

Der Promotor des Menschen und des Kaninchens enthält zwei Bindungsorte der CREB/AP-1-Familien an den Positionen -52 und -94. Beide Familien sind Untergruppen der Leucin-Zipper-Klasse der TF. Dieses Motiv bezieht sich auf eine Domäne in der Proteinstruktur der TF, mit deren Hilfe die Faktoren hetero- bzw. homodimerisieren. Die Familie der

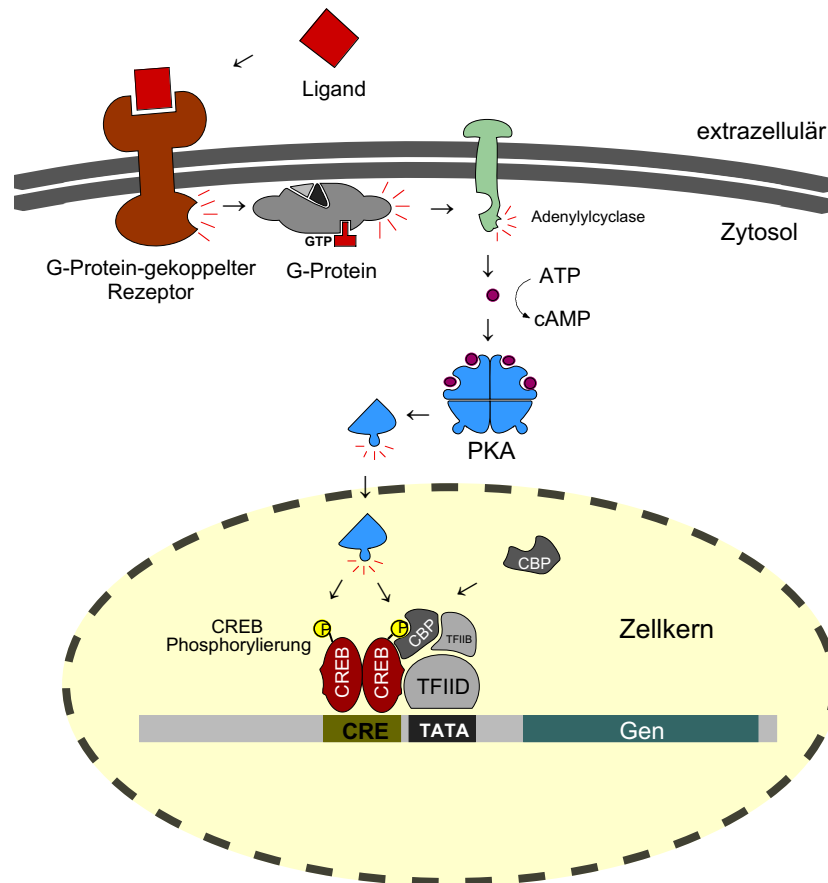
AP-1-ähnlichen Faktoren besteht aus sieben Unterfamilien mit über 50 Vertretern, wozu Jun, Fos, Maf, NF-E2, AP-1 ähnliche Faktoren der Pilze und CRE-BP/ATF gehören. Die Protooncogene Jun und Fos spielen eine wichtige Rolle in der Wachstumskontrolle der Zelle. Dies wird durch die Beobachtung der malignen Transformation durch bestimmte tierische Viren gestützt, die diese TF als Oncogene übertragen (**Varmus und Weinberg 1994**). Zu der Jun Unterfamilie gehören XBP-1, v-Jun, c-Jun, JunB, JunD und dJRA. Der Fos Unterfamilie gehören v-Fos, c-Fos, FosB1, FosB2, Fra-1, Fra-2, dFRA und LRF-1 an. Als AP-1 bezeichnet man einen dimeren Komplex zwischen den Faktoren einer oder zweier Untergruppierungen der AP-1 ähnlichen Faktoren. Bekanntgeworden ist die AP-1 Familie durch den c-Jun/c-Fos Komplex, von dem mittlerweile Strukturmodelle existieren (Abb. 5-5).



**Abb. 5-5 Modell der Wechselwirkung von AP-1 Komponenten mit cis-Elementen** (aus Varmus und Weinberg 1994). LZ=Leucin-Zipper-Strukturmotiv

Nach der Dimerisierung an spezifischen DNA-Sequenzen erfolgt die Aktivierung der Faktoren. Vom TF c-Jun ist bekannt, daß er mit dem CREB bindenden Protein (CBP) wechselwirkt (**Ariaset al. 1994**). Dieser Faktor nimmt seinerseits Kontakt mit dem allgemeinen TF TFIIB auf (**Kwok et al. 1994**), wodurch eine Verstärkerfunktion des AP-1-Komplexes erklärbar wird. Man nimmt an, daß verschiedene Hetero-/Homodimere unterschiedliche DNA-Bindungssequenzen besetzen und sich auch in der Regulierung unterscheiden. Die Bindungsregion des AP-1-Komplexes wird wegen der induktiven Beeinflußbarkeit durch Phorbol ester auch als TPA responsables Element (TRE) bezeichnet.

Die zweite Familie von TF, die eine dem AP-1 Bindungsort sehr ähnliche Sequenz erkennt, ist die mittlerweile aus über 30 Mitgliedern bestehende CREB-Familie. Wie AP-1 gehört sie zur Klasse der Leucin-Zipper-Faktoren und setzt sich aus den Untergruppen CREB, ATF-1, CREM, BBF-2, dCREB2, SKO1, HAC1 und PCR1 zusammen. Weitere Gemeinsamkeiten zu AP-1 sind die Fähigkeit zur Homo - und Heterodimerisierung. Die Aktivierung der Faktoren geschieht genau wie bei AP-1- durch Phosphorylierung durch spezifische Kinasen. Der bisher am besten untersuchte Vertreter der CREB-Familie, CREB 1, wird durch die Proteinkinase A (PKA) an Position Serin-133 phosphoryliert. Die Namensgebung CREB: für cAMP responsables Element (CRE) - bindendes Protein trägt diesem Sachverhalt Rechnung. CREs reagieren auf eine Signalkaskade, die über Aktivierung bestimmter Rezeptoren: G-Proteine → Adenylylcyclase → cAMP → und PKA- Aktivierung abläuft. Nach der CREB Phosphorylierung ist der dimere Komplex in der Lage mit CBP zu wechselwirken (**Kwok et al. 1994**), einem ebenso an AP-1 bindenden Faktor. Dem CBP kommt somit eine Brückenfunktion zwischen allgemeinen und speziellen TF zu (Abb. 5-6).



**Abb. 5-6 Modell PKA abhängiger Signaltransduktionsprozesse:** Bestimmte Rezeptoren führen nach Bindung eines Liganden über die dargestellten Signaltransduktionsprozesse zur Aktivierung der PKA. Deren katalytische Untereinheit gelangt in den Zellkern und phosphoryliert Transkriptionsfaktoren wie CREB, wodurch es anderen Transkriptionsfaktoren (CBP) ermöglicht wird am Promotor zu binden und somit die Aktivität des Gens modifiziert wird.

Weitere Untersuchungen konnten zeigen, daß CREB mit einer Komponente von TFIID interagiert (**Ferreri et al. 1994**), eine Tatsache, die mit der basalen Enhancerfunktion der CREBs korrelieren könnte (**Quinn 1993**). Untersuchungen über die Spezifität der AP-1 Bindung an TREs und der CREB Bindung an CREs konnten zeigen, daß hier keine absolute Zuordnung besteht. Zwar gibt es für spezifische dimere TF Präferenzen für spezielle Sequenzmotive, doch kommt es auch zur Bindung von CREB an TREs und AP-1 Komplexen an CREs (**Fink et al. 1991**). Darüber hinaus wurden Dimere zwischen Mitgliedern der AP-1 und der CREB Familie z.B. CREB/c-Jun beschrieben (**Benbrook und Jones 1990**). Damit wird ersichtlich, daß es keine echte Trennung zwischen diesen beiden TF-Subfamilien gibt.

Die beiden CREB/AP-1 Elemente im *TPT1*-Promotor sind nicht identisch. Das erste Element an Position -52 (TGACGTAG) hat beim Kaninchen als wahrscheinlichste Bindungspartner die

Faktoren CREB1 und CREB2. Das humane Pendant weicht in den letzten beiden Positionen von der Kaninchensequenz ab (TGACGTC A). Dies hat die Konsequenz, daß sich die Bindungswahrscheinlichkeit, zugunsten der Kombination CREB1/CREB1 oder CRE-BP1/c-JUN verschiebt. Beim Menschen ist dieses Motiv als einziges von zweien 100% homolog zum Konsensusmotiv der angegebenen TF, was die Wahrscheinlichkeit für eine physiologische Bedeutung erhöhen dürfte. Die Faktorenkombination CRE-BP1/c-JUN erscheint im Lichte der TPA-Induzierbarkeit als eine interessante Möglichkeit, da die phorbolsterinduzierte Aktivierung der PKC mit der Phosphorylierung von c-Jun und CRE-BP1 einhergeht und beide Faktoren ebenso Substrate der JNK/MAP-Kinase-Signalkaskade sind. Sollten zusätzlich CREB-Faktoren funktionell am Promotor binden können, würde man eine cAMP/PKA abhängige Responsibilität erwarten, eine bis heute nicht untersuchte Fragestellung, die man durch die Induzierbarkeit des *TPT1*-Promotors durch cAMP Analoga bzw. PKA-Aktivatoren (z.B. Forskolin) überprüfen könnte.

Das zweite CREB/AP-1-Motiv des *TPT1*-Promotors befindet sich an Position -88. Das in Abb. 5-3 angegebene Konsensusmotiv beinhaltet die Erkennungssequenz für den TF CREB 2, für den beim humanen Promotor 97,4%ige Matrixübereinstimmung, beim Kaninchenpromotor 88,8%ige Übereinstimmung gefunden wurde. Für den Faktor ATF verhalten sich die Konsensusmotive etwas anders: 96,6% (human) und 95,8% (Kaninchen). Die Tatsache, daß trotz der hohen Interspezieskonservierung des Bindungsmotives (nur eine Base Unterschied) sehr unterschiedliche Präferenzen für die einzelnen Mitglieder der CREB-Familie bestehen, mag auf Details in der Bewertung und auf die Anzahl der vorhandener Datensätze, die in die Bewertung der TF-bindungsdominierenden Sequenzen der zum Teil recht spärlichen Literatur eingegangen sind, zurückzuführen sein.

Der hochkonservierte Promotorbereich enthält zwei Bindungsstellen für den TF ETS-1. Interessanterweise wurden TREs in Verbindung mit ETS-1 Faktoren gefunden. Funktionell bedeutende AP-1 und ETS Bindungsorte sind in einer Vielzahl von Genkontrollregionen als Hinweis auf eine additive Kooperation beider Elemente beschrieben worden (**Newberry et al. 1997, Majerus et al. 1992, Noti et al. 1996**). Aus mechanistischer Sicht scheint eine direkte Wechselwirkung zwischen der basischen Domäne von c-Jun und der ETS-Domäne des TF ETS-1 zu bestehen. Damit kommt es zu einem trimolekularen Komplex aus ETS, c-Jun und

anderen Mitgliedern der AP-1-Familie, etwa c-Fos (**Bassuk und Leiden 1995**). ETS kann selber wiederum mit dem CBP und damit assoziiertem p300 Molekül wechselwirken (**Yang et al. 1998**). Die schon erwähnte Brückenfunktion des CBP/p300 ist begleitet von einer Histon-Acetyltransferase-Aktivität. Damit würde sich ein weiterer Mechanismus erschließen, mit dem CBP seine Verstärkerfunktion erfüllt, indem es lokale Veränderungen der Chromatinstruktur bewirkt und damit den Promotorbereich für andere allgemeine und spezielle TF freilegt. Hier offenbart sich ein gewisser Schwachpunkt der Transfektionsexperimente, da die verwendeten Reportervektoren keine adäquate Chromatinstruktur ausbilden dürften.

Die im *TPT1*-Promotor identifizierten c-ETS-1p54 TF-Bindungsstellen repräsentieren einen TF aus der "Helix-turn-helix" Superfamilie - Klasse: Tryptophan-Cluster, Familie: ETS-ähnliche Faktoren, Unterfamilie: c-ETSs-1. Circa 40 TF gehören zu der Familie der c-ETS - darunter c-ETS-1p54 (<http://transfac.gbf.de/TRANSFAC/index.html>). ETS-ähnliche Proteine gehören zu den Proto-Oncogenen, werden als wichtige Komponenten TATA-Box-loser Promotoren beschrieben, haben Bedeutung in wachstums- und zellzyklusspezifischen Aktionen und scheinen in die T-Zellaktivierung involviert zu sein (**Wasylyk et al. 1993**). Insgesamt spricht die Präsenz von zwei ETS-1 Faktoren und zwei Mitgliedern der CREB/AP-1 Familie im hochkonservierten Promotorbereich des *TPT1*-Gens und die gesicherte additive Kooperation beider TF-Familien in anderen oncogen-responsiblen Promotoren für deren Beteiligung in der *TPT1*-Transkriptionkontrolle.

Ein weiterer TF im konservierten Promotorbereich (Position -114) - SP-1 - verdient genauere Betrachtung. Die Bindungsregion dieses Faktors ist in beiden Spezies zu 100% konserviert und die Matrixübereinstimmung mit 99,6% sehr hoch. Schon aus dieser Konstellation ist eine Beteiligung des TF SP-1 sehr wahrscheinlich. SP-1 findet man in allen Geweben und beteiligt sich in einer Vielzahl von Promotoren regulativ. Er gehört in die Klasse der Zink-koordinierten DNA-Bindungsdomänen und ist Mitglied der Cystein2-Histidin2-Zinkfinger-Domänen Faktoren. Seine Verstärkerfunktion wurde auf verschiedene Weise postuliert. Dazu gehört die direkte Interaktion mit einer Untereinheit des Holo-TFIID-Faktors. Dieser setzt sich aus acht TAFs (TAFII250, TAFII150, TAFII110, TAFII80, TAFII60, TAFII40, TAFII30 $\alpha$ , TAFII30 $\beta$ ) und TBP zusammen. Es konnte gezeigt werden, daß der TAFII110 für eine SP-1 responsible Aktivierung verantwortlich ist (**Gill et al. 1994**). Andere Autoren beschreiben die Bildung von



SP-1-Tetrameren, die in der Lage sind, entfernte Promotorbereiche durch Schleifenbildung zu überbrücken (**Mastrangelo et al. 1991**). Der für diesen Mechanismus essentielle zweite SP-1 Bindungsort findet im *TPT1*- Promotor keine direkte Entsprechung. Zwar existiert ein weiterer SP-1 Ort an Position -216 des Human- Promotors, aber dieser ist nicht stark konserviert. Als Hypothesen könnten weitere SP-1 Orte jenseits der sequenzierten 1.2 kb Kaninchenpromotor-Sequenz oder eine direkte Wechselwirkung des TF SP-1 mit TFIID angenommen werden.

In der Beschreibung der restlichen Promotorsequenzen fällt eine Häufung von MZF-1 Elementen auf. In den 500 bp Promotorsequenzen von Mensch und Kaninchen existieren zwei konservierte Konsensusbereiche. Dazu kommt ein weiterer MZF-1 Ort an Position +17 und zwei weitere MZF-1 Orte im Kaninchenpromotor jenseits der 500 bp-Grenze (Abb. 4-12). MZF-1 wird genau wie SP-1 der Überfamilie: Zinkfinger-Bindung, Klasse der Cys2His2 Zinkfinger zugeordnet, wird jedoch nicht ubiquitär exprimiert und wegen seiner strukturellen und funktionellen Verwandtschaft mit dem entwicklungs- und zellzyklusreguliertem TF Krueppel gemeinsam in eine andere Unterfamilie eingeordnet. Seine Transkripte werden überwiegend in myeloiden Zelllinien einer frühen Differenzierungsphase - Myelozyten und Metamyelozyten - gefunden, jedoch scheinen alternative Transkripte auch in Leber- und Plazentazellen vorzukommen (**Hromas et al. 1991**). Sollten MZF-1 Faktoren in der Regulierung des *TPT1*-Gens eine Rolle spielen, würde man eine spezifische Modulation in den genannten Zelllinien erwarten.

Der ebenfalls konservierte TF STAT-1 befindet sich an Position -412 des Kaninchenpromotors. Seine Aktivität wird durch eine Reihe von Signaltransduktionen, bekanntermaßen durch den JAK-STAT, aber auch durch PKC, PKA, MAP-Kinase, Ras und PI3K involvierende Signalwege bestimmt (**Weber-Norst et al. 1998**). Seine inhibitorischen,  $\gamma$ -Interferon induzierten Effekte auf das Makrophagen-Radikalfänger-Rezeptorgen erklärt man sich durch die direkte Wechselwirkung von STAT-1 mit CBP/p300. Dadurch würden den aktivierenden AP-1/ETS Faktoren dieses Promotors die erforderlichen CBP/p300 Komponenten durch Competition entzogen (**Horvai et al. 1997**). Andere Autoren konnten eine direkte synergistische aktivierende Wechselwirkung zwischen SP-1 und STAT-1 im Gen des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 nachweisen (**Look et al. 1995**). Somit existieren Fakten für sowohl hemmende als auch aktivierende STAT-1-Funktionen. Für die Beteiligung des STAT-1 Faktors am *TPT1*-Promotor

sprächen neben seiner Interspezieskonservierung vor allem zwei Argumente: 1. könnte der *TPT1*-Promotor analog dem Makrophagen-Radikalfänger-Rezeptorgen durch AP-1/ETS Faktoren reguliert werden, und 2. zeigten die CAT-Assays einen leichten Abfall der Aktivität jenseits der -379 Grenze, wie man es auf Grund der postulierten hemmenden STAT-1-Effekte erwarten würde.

Betrachtet man die CAT-Assays, so zeigt sich ein deutlicher Sprung in der Aktivität zwischen den Positionen -166 und -291. Im Kaninchenpromotor befinden sich in diesem Bereich Bindungsstellen für zwei NF-1 Faktoren. NF-1, der zu einer eigenen Klasse von Proteinen mit basischen Domänen gehört, hat als ubiquitärer Faktor Bedeutung für eine Vielzahl von Genen. Im *TPT1*-Promotor des Menschen befindet sich nur ein NF-1 Ort, der jedoch in entgegengesetzter Orientierung angeordnet ist, und deshalb keine Homologie zum Kaninchen zeigt. Obwohl die cis-Elemente erheblich voneinander abweichen sind für beide Motive identische Matrixhomologie von 94,2% angegeben, d.h. trotz ihrer Verschiedenheit könnten die Elemente von Mensch und Kaninchen als äquivalent betrachtet werden. Da die Orientierung von NF-1 nicht ausschlaggebend für seine Verstärkerfunktion zu sein scheint, ist die Bedeutung dieses cis-Elementes zumindest nicht auszuschließen.

Andere Faktoren in diesem Promotorfragment sind ein nicht konservierter SP-1-Faktor und ein konservierter und ein nicht-konservierter MZF-1 Faktor.

Tabelle 7 faßt noch einmal die im wesentlichen gefundenen TF im Promotorfragment +1 bis -500 unter dem Gesichtspunkt der Positionen, Bindungsmotive und Matrixübereinstimmungen zusammen. Auf die Diskussion der im Kaninchenpromotor jenseits der -500 bp vorkommenden TF-Bindungsmotive (Abb. 4-12 u. Abb. 5-2) soll hinsichtlich des stark spekulativen Charakters ihrer Bedeutung verzichtet werden.

CAT-Fragment	TF Name (trans-Faktor)	Position human (Orient.)	Position Kan. (Orient.)	Matrix-hum. %	Matrix-Kan. %	Sequenz human (cis-Element)	Sequenz Kaninchen (cis-Element)
-66/79	MZF-1	-22 +	-22 +	97,1	97,1	gttGGGGa	gttGGGGa
	CREBP1/cJUN	-52 +/-	-52 +/-	100	85,1	tgACGTca	tgACGTag
	CREB1	-52 +/-	-52 +	100	96,2	TGACgtca	TGACgtag
	AP1/Fos-Jun	-53 -	-53 +	93,2	94,3	cgtGACgtcat	gaTGACgtaga
	CREB2	-54 +	-54 +	98,2	96,7	gcgaTGACgtca	acgaTGACgtag
	ATF1	-56 +	-56 +	98,0	94,5	ccgTGACgtcatcg	cgaTGACgtagaag
-166/79	ETS-1-p54	-76 +	-76 +	97,4	97,2	tcCGGAagcg	ccCGGAagcg
	CREB1	-94 -	-94 -	93,1	93,1	TGACgtgg	TGACgtgg
	CREB2	-94 -	-94 -	97,4	91,3	gcggTGACgtgg	gcagTGACgtgg
	ATF-1	-97 -	-97 -	96,6	95,8	cggTGACgtggcac	cagTGACgtggcac
	SP-1	-121 -	-121 -	99,6	99,6	cgggGGCGggggcc	cgggGGCGggggcc
	MZF-1	-142 -		95,7		gtcGGGGa	
	ETS1-p54	-156 +	-163 +	95,1	96,8	ccCGGAtgct	ccCGGAtgct
-291/79	NF-1		-182 -		97,3		actTGGCtgggagccgcg
	MZF-1	-223 -		98,2		ggcGGGGt	
	SP-1	-224 -		96,7		tgggGGCGgggag	
	MZF-1	-242 -	-242 -	100	97,4	agtGGGGt	gatGGGGa
	NF-1	-254 +	-266 -	94,2	94,2	agtTGGCctccctcccca	ggtTGGCgggggctctat
-379/79	MZF-1	-294		95,9		gcgGGGGa	
	CP2	-367 +		98,2		gctccacCCAG	
	S8	-383 -		94,5		ttagaggaATTaaact	
	TST-1	-385 -		99,3		gaggAATTaaacttt	
-918/79	STAT-1	-429 +	-413 +	98,0	98,0	TTCCcagaa	CTCCcagaa

**Tabelle 7 Gegenüberstellung von Bindungsmotiven für TF im Human- und Kaninchenpromotor:** Dargestellt werden die Positionen, Orientierungen (+/-), prozentualen Matrixübereinstimmungen und Bindungsmotive der TF. Der 4 bp und großbuchstabig dargestellte Teil des Bindungsmotives entspricht der Kernsequenz der Bindung und entspricht bei allen TF 100% (Ausnahme STAT-1 beim Kaninchen).

Da funktionelle TF-Bindungsstellen innerhalb intronischer Sequenzen beschrieben wurden, ist im *TPT1*-Gen nach entsprechenden cis-Elementen gesucht worden. Eine Auswahl von jeweils drei der am besten passenden Faktoren pro Intron faßt Tabelle 8 als Ergebnis der Analyse zusammen. Inwieweit diese TF eine Rolle spielen könnten ist derzeit nicht abzuschätzen, jedoch muß diese Möglichkeit als eher unwahrscheinlich angesehen werden, da sich die regulären Promotorfragmente in den funktionellen Analysen als effiziente Verstärker der Expression erwiesen haben.

	TF (trans-Faktor)	Position (Orient.)	Matrix	Sequenz (cis-Element)
Intron 1	CREL 1	233 +	95,3	cggcttTTCC
	SP-1	282 +	96,8	gaggGGCGggggc
	MZF-1	354 -	97,5	cgcGGGga
Intron 2	MZF-1	460 +	95,9	gcgGGGga
	CEBPB1	511 +	98,4	aggttgtGCAAtc
	MZF-1	525 -	98,2	ggcGGGga
Intron 3	CP2	1193 -	97,9	gctcaagCCAG
	DELTAEF-1	1236 -	95,8	ccccACCTagg
	GATA 1	1359 +	96,0	ctagtGATAactga
Intron 4	CDPCR3HD-1	1636 +	98,2	cattGATCtg
	NKX25 1	1881 +	98,5	ttAAGTg
	NKX25 1	2146 +	100	tcAAGTg
Intron 5	SOX5-1	2822 -	98,4	ctaaCAATct
	NF-KAPPAB-1	3170 -	98,3	gggattTTCC
	CREL 1	3170 -	98,0	gggattTTCC

**Tabelle 8 Potentielle Bindungsmotive für TF in Introns des Kaninchen *TPT1* Gens**

### 5.3 Die Strukturen der TCTP-mRNAs

Die bis dato veröffentlichte Kaninchen TCTP-mRNA Sequenz zeichnete nur ein unvollständiges Bild von dem in vivo vorkommenden Expressionsmuster. Zum einen war die veröffentlichte Sequenz fehlerhaft und unvollständig, zum anderen fehlte bislang der Hinweis auf alternative TCTP-mRNAs. Dies konnte durch Screening einer cDNA-Bank, Northernblotanalysen und Aufklärung der genomischen Situation eindeutig belegt werden und scheint beim Menschen (**Bonaldo et al. 1996**), und höchstwahrscheinlich auch bei anderen Spezies, ebenso zu sein. In dieser Arbeit werden erstmals die genauen Strukturen der bisher gefundenen Kaninchen TCTP-mRNAs vorgestellt.

Neben der Eliminierung von Sequenzierfehlern konnte eine exakte Bestimmung der 5'UTR vorgenommen werden. Sie hat eine Länge von 116 bp und weist eine hohe Homologie zur Maus- und Humansequenz auf. Die Ermittlung der kompletten 5' UTR Sequenzen von mRNAs aus cDNA Banken ist eine bekannte Schwachstelle, da das 5'-Ende, bedingt durch die Klonierungstechnologie, sehr oft unvollständig ist. Auch die Methode der "primer extension analysis" hat diesbezüglich ihre Tücken. Bei diesem Verfahren sequenziert man aus der Summe aller cDNAs mit spezifischen Primern Richtung 5'UTR und bestimmt die Abbruchposition. Da es aber oft vorkommt, daß unspezifische Transkripte entstehen, die Folge von stromaufwärts

gelegenen Gebieten schwacher Promoteraktivität sind, erhält man hier oft zu lange Transkripte. Die Analyse der *TPT1*-Pseudogene eröffnete deshalb eine gute Alternative zu den bekannten Verfahren. Prozessierte Pseudogene verstehen sich in diesem Fall als eine Form von in vivo generierter cDNA mit oftmals intakt erhaltenem 5'-Ende. Die vergleichende Analyse mehrerer kaum mutierter prozessierter *TPT1*-Pseudogene eröffnete deshalb die Möglichkeit, die echten 5'-Enden der TCTP-mRNAs und damit die Position der Transkriptionsinitiation im *TPT1*-Gen exakt zu rekonstruieren. Es bestätigte sich mit den hier vorgelegten Ergebnissen, daß neben der Maus-mRNA auch die Human- und Kaninchen-TCTP-mRNA einen echten Polypyrimidin-Trakt am 5'-Ende tragen.

Die Erstbeschreibung des TCTP als Q23 geht auf die systematische Suche nach posttranskriptionell regulierten mRNAs zurück (**Yenofsky et al. 1983**). Der Translationsarrest von TCTP-RNPs in ruhenden Zellen ließ sich ursächlich größtenteils auf Sequenzen in der 5'UTR eingrenzen, obwohl auch Bereiche der 3'UTR involviert zu sein schienen (**Böhm et al. 1991**). Eine andere Gruppe von mRNAs reagiert ebenso wie TCTP auf exogen-mitogene Stimuli mit einer Aufhebung des Translationsarrestes inaktiver RNPs. Es handelt sich um die Transkripte ribosomaler Proteine wie S16, L32, L7 und anderer (**Jefferies et al. 1994**). Auf der Suche nach Mechanismen fand man eine konservierte Polypyrimidin-Struktur direkt 5'terminal der mRNA. Allen untersuchten Polypyrimidin-Trakten war ein strikt konserviertes Cytidin am Beginn des Messengers gemeinsam, gefolgt von einer variablen Anzahl von 5-14 Pyrimidinen (**Levy et al. 1991, Avni et al. 1994, Severson et al. 1995, Shama et al. 1996**). Dieses Strukturmotiv (CY<sub>(n)</sub>) kommt in den TCTP-mRNAs der bisher 5'UTR-seitig komplett sequenzierten Spezies Kaninchen und Mensch (CTTTTCCG) sowie Maus (CTTTTTTCCG) auch vor. Die Bedeutung des Polypyrimidintraktes für die Translationskontrolle der TCTP-mRNA geht auch aus Hemmstoffstudien mit dem Antibiotikum Rapamycin hervor. Genau wie alle einen funktionellen Polypyrimidin-Trakt enthaltenden Transkripte läßt sich die TCTP-Expression durch Rapamycin in mitogen aktivierten Zellen selektiv blockieren (**Jefferies et al. 1994**). Dies wird auf eine Hemmung der p70<sup>s6k</sup>/p85<sup>s6k</sup> Kinase-Isoformen zurückgeführt, die das 40S ribosomale Protein S6 spezifisch phosphorylieren, jedoch scheinen noch andere Faktoren eine Rolle zu spielen (**Jefferies et al. 1994**).

Eine Besonderheit des *TPT1*-Gens ist die Fähigkeit zur Generierung unterschiedlich langer mRNAs. Die bisher entdeckten Möglichkeiten der Bildung alternativer Transkripte von einem Gen beinhalten die alternative Verwendung von Transkriptionsstartpunkten, alternatives Spleißen und alternative Polyadenylierung. Jedes der genannten Prinzipien zielt auf andere Strukturen der mRNA. Alternative Promotoren generieren meist unterschiedlich lange 5'UTRs, alternatives Spleißen führt meistens zu Veränderungen in der kodierenden Sequenz und damit der Proteinstruktur (Ausnahmen sind Exons, die alternative UTRs miteinschließen), während alternative Polyadenylierung zu Veränderungen der 3'UTR führt. Ein Beispiel für die Benutzung aller drei Regulationsformen ist das Gen für den TF Zfp-37 (**Mazarakis et al. 1996**).

Die Northernblots (Abb. 4-3, S.38) zeigten zwei TCTP-Signale von 0,8 und 1,2 kb Größe, ohne daß eine Aussage zu Feinstrukturen möglich gewesen wäre. Das Screening der cDNA-Bank führte dann zur Identifizierung eines neuen TCTP-Klones, der sich von der publizierten cDNA neben geringfügigen Sequenzunterschieden durch eine um 320 bp verlängerte 3'UTR unterschied. Zusammen mit der Analyse des *TPT1*-Gens war klar, daß beide Transkripte vom selben Gen abstammen mußten, da die verlängerte 3'UTR2 ihr Äquivalent im Gen unmittelbar im Anschluß an die 3'UTR1 hatte und dem Abbruchpunkt der 3'UTR2 ein Polyadenylierungssignal unmittelbar vorausging.

Die Frage, die es zu beantworten galt war, worin die Funktionen der unterschiedlichen mRNAs liegen. In der Molekularbiologie steht die Erforschung der untranslatierten Regionen der mRNAs erst am Anfang. Die funktionelle Bedeutung der 3'UTRs eukaryontischer mRNAs wird heute für drei Gebiete diskutiert: Translationseffektivität, Stabilität und intrazelluläre Lokalisation (**Decker und Parker 1995**). Gesicherte Erkenntnisse gibt es über mRNA destabilisierende, AU-reiche Sequenzmotive, die vor allem bei besonders kurzlebigen mRNAs gefunden werden, wie sie typisch für Messenger von Wachstumsfaktoren und Cytokinen sind (**Scheper et al. 1995**). Ein gut untersuchtes Beispiel für die Kontrolle der Translationseffektivität über 3'-UTR bindende Proteine ist die 15-Lipoxygenase mRNA (**Ostareck et al. 1997**). Eine weitere Funktion von 3'UTRs wurde in der intrazellulären Lokalisation des Messengers gezeigt (**Decker und Parker 1995**). Die TF hunchback, bicoid und Krüppel sind hierfür Beispiele (siehe S. 18.).

Es gibt zahlreiche Beispiele für die Existenz von mRNAs mit alternativen 3'-UTRs, deren Bedeutung jedoch nicht immer bekannt ist. Häufig sind Varianten jedoch den oben genannten drei Kategorien zuzuordnen. So ist beispielsweise das lange Transkript der eLF-2a mRNA stabiler als das kurze (Miyamoto et al. 1996). Oft sind mRNAs mit alternativen 3'UTRs gewissen Entwicklungsstadien oder Gewebetypen zuzuordnen. Eine gewebsspezifische Expression alternativer 3'UTRs findet man z.B. bei der 15-Lipoxygenase des Kaninchens (Thiele et al. 1999). Um festzustellen, ob es auch eine Gewebsspezifität der Expression der beiden TCTP-mRNAs gibt, wurden ein mRNA-Dotblot einer Vielzahl von Humangeweben mit einer Sonde von kodierenden Bereichen der TCTP-mRNA und anschließend mit einer 3'UTR2 spezifischen Sonde hybridisiert (Abb. 4-6, S. 42). Die Transkriptionsmuster der beiden TCTP-mRNAs erbrachten mehrere neue Erkenntnisse. Eine wichtige Information war, daß TCTP in allen 50 untersuchten Geweben transkribiert wurde, jedoch mit quantitativen Unterschieden von bis zu 1:100. Daraus ließ sich der Schluß ableiten, daß *TPT1* weder zu den gewebsspezifischen Genen noch zu den Haushaltsgenen gehört. Die Regulation des *TPT1*-Genes hängt offenbar von Faktoren ab, die in den untersuchten Geweben unterschiedlich ausgeprägt oder moduliert sind.

Das Verhältnis des kurzen zum langen Messenger erwies sich in den Geweben als nicht konstant (Abb. 4-7, S. 43). Einige Hirngewebe wie Hippocampus, Hirnrinde oder Frontalhirn exprimierten im Verhältnis mehr TCTP-mRNA1 zu TCTP-mRNA2 als dies in anderen Geweben, wie Leber, Herz oder Nebenniere der Fall ist. Unbekannt ist der dafür in Frage kommende Mechanismus.

Die hier vorgestellten Experimente haben klargemacht, daß TCTP für alle Gewebsarten gleichermaßen zu einem wichtigen Strukturelement gehört. Alle Daten deuten darauf hin, daß eine genaue Regulierung des Proteinniveaus sowohl im Zellzyklus als auch gewebsspezifisch zu den charakteristischen und notwendigen Eigenschaften des TCTP zählt. Die Analyse der *TPT1*-Genkontroll-Region lieferte neue Hinweise für eine Involvierung des Gens in bestimmte Signaltransduktionsprozesse und betont damit die Bedeutung der transkriptionellen neben der posttranskriptionellen Regulation. Die Tatsache daß alternative TCTP-Transkripte existieren, die sich nur in der Länge der 3'UTR unterscheiden macht eine Beteiligung der 3'UTR an der posttranskriptionellen Regulation wahrscheinlich. Diese drückt sich jedoch scheinbar nicht in einer Gewebsspezifität aus, wie diese Arbeit eindeutig zeigen konnte. Zukünftige

Forschungsstrategien sollten sich daher anderen Erklärungsansätzen widmen, wie der Frage nach der intrazellulären Lokalisation der beiden Messengertypen, Untersuchungen zur Stabilität der Transkripte oder ob die beiden TCTP-mRNP-Komplexe abhängig vom Zellzyklus in gleicher Weise mit einer Aufhebung des Translationsarrestes in mitogen stimulierten Zellen reagieren.

## 5.4 (Un)sinn der Pseudogene

Das Genom des Menschen enthält schätzungsweise 50000-70000 Gene, die nur für einen Bruchteil seiner Größe verantwortlich sind. Woraus die scheinbar überflüssigen restlichen Sequenzen bestehen, beginnt man nach und nach besser zu verstehen. Mit dazu beigetragen hat das humane Genomprojekt, das immer größere Bereiche der DNA offengelegt und einer systematischen Analyse zugänglich gemacht hat. Im Kap 2.4 ist auf wesentliche Bestandteile dieser DNA eingegangen worden.

Prozessierte Pseudogene findet man überwiegend bei Vertebraten, und ihre Genese wie ihre Bedeutung ist bis heute umstritten. Die Mehrzahl der gefundenen Pseudogene dürften keine Funktionen inne haben, da die ORFs durch zahlreiche Mutationen zerstört wurden und ihre Expression generell in Frage steht. Wieso gerade bei höheren Eukaryonten die Tendenz zur Akkumulation selbstischer DNA besteht, wurde durch die Annahme des fehlenden Selektionsdruckes diese Sequenzen zu eliminieren erklärt (**Alberts et al. 1995**).

Trotzdem wurde immer wieder die Frage nach einer möglichen Bedeutung der Pseudogene gestellt. Diese ergab sich insbesondere bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *TPT1*-Pseudogenen, die durchweg hohe Homologien zu den korrespondierenden cDNAs aufwiesen. Neben den intakten ORFs und wenigen konservativen Aminosäure-Austauschen in der kodierenden Sequenz, legte die überraschenden CAT-Aktivität der 5' flankierenden Bereiche von zwei der untersuchten Pseudogene eine mögliche Exprimierbarkeit nahe.

Prinzipiell ist die Existenz stark konservierter Pseudogene nicht als ungewöhnlich anzusehen. Jedes Pseudogen müßte zum Zeitpunkt seines Einbaues in das Kerngenom 100% Homologie zu seiner Matrizen-mRNA aufweisen. Von da an divergieren das Gen und das Pseudogen auf getrennten Wegen, das Pseudogen mutiert mit hoher Frequenz, während das Gen unter Selektionsdruck stehend stärker konserviert werden wird. Demzufolge wäre es legitim, die



gefunden *TPT1*-Pseudogene des Kaninchens als evolutionär jung einzustufen. Diese Divergenz erklärt auch, wieso einige *TPT1*-Pseudogene identische Mutationen aufweisen. Man könnte dies als eine evolutionäre Augenblickaufnahme des Gens zum Zeitpunkt der Pseudogenentstehung betrachten. Auf diese Weise sollten sich neue Einblicke in die Evolution des *TPT1*-Gens ergeben.

Eine andere Erklärung für die starke Homologie aller näher untersuchten Pseudogene berücksichtigt das Auswahlverfahren der Lambdaklone. Da es sich bei dem Screening der Phagenbanken um Hybridisierungstechniken handelt, sind die stärksten Signale bei den Klonen mit der höchsten Homologie zur eingesetzten Sonde zu erwarten. Außerdem besteht bei stark mutierten Sequenzen die Gefahr, daß sich die Sonde bei den Waschprozeduren wieder ablöst, und somit eine methodisch bedingte Selektion von stark homologen Sequenzen erreicht wurde.

In der Literatur gibt es nur wenige Fälle einer gesicherten Funktionalisierung von Pseudogenen. Von einigen Autoren wird die Existenz eines zweiten Insulingens bei der Ratte und der Maus als solch ein Ereignis gedeutet (**Weiner et al. 1986**). Diese Gen enthält ein Intron weniger, ZSDs von 41 bp und Poly-A-reiche Sequenzen im Anschluß an die Gensequenz, so daß es sich um den retrograden Einbau einer teilprozessierten Insulin-mRNA handeln könnte. Von anderer Seite wurde bekannt, daß eine Ferritin L Untereinheit der Maus wahrscheinlich von einem intronlosen Gen kodiert wird (**Renaudie et al. 1992**). Kürzlich wurde ein nicht-prozessiertes Pseudogen der 12-Lipoxygenase des Plättchentyps beim Menschen beschrieben, das in mRNA transkribiert wird, die jedoch nicht funktionell ist (**Sun et al. 1999**). Intronlose Gene sind bei höheren Eukaryonten wie der Maus ausgesprochen rar, und neben der Möglichkeit des selektiven Verlustes von Introns sind prozessierte Pseudogene als alternative Entstehungsform in Betracht zu ziehen.

Zum jetzigen Zeitpunkt deutet sich an, daß prozessierte Pseudogene tatsächlich Funktionen in Zellen übernommen haben können, dies jedoch nur Ausnahmererscheinung sind.

Die Existenz von *TPT1*-Pseudogenen beim Kaninchen und der Maus (**Bommer, persönliche Mitteilung**) ließ eine ähnliche Konstellation beim Menschen vermuten. Die umfangreichen Daten, die das Human- Genomprojekt derzeit zur Verfügung stellt, legten den Versuch nahe, in Datenbanken nach Anhaltpunkten für humane *TPT1*-Pseudogene zu suchen. In der Tat konnten



kein Beweis für die tatsächlich stattfindende in vivo Transkription, da sich die DNA der Pseudogenumgebung in einem inaktivem Chromatinzustand befinden könnte. Beweisend wäre ein TCTP-cDNA-Klon mit dem identischen Mutationsmuster der Pseudogene, nach dem gesucht werden müßte. Alternativ wären PCRs mit die Mutationen überdeckenden Primerkombinationen denkbar. Schwierig ist der Nachweis einer in vivo Translatierbarkeit. In vitro bieten sich zellfreie Transkriptions-/Translationssysteme an.

Zu bedenken ist in diesem Zusammenhang, daß exprimierbare Pseudogene mit knock out Experimenten interferieren könnten. Die kürzlich erwähnten *TPT1*-Gen knock outs der Hefe (Sanchez et al. 1997a) wären davon wahrscheinlich aber nicht betroffen, da prozessierte Pseudogene als besonderes Charakteristikum von Säugetieren in Hefen sehr selten sind. Bei Säugern müßten entsprechende Experimente berücksichtigen, daß prozessierte Pseudogene die Funktion des echten Gens kompensieren könnten.

## 5.5 Ausblicke

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse verstehen sich als Einstiegspunkt in die Erforschung der Regulation des *TPT1*-Gens. Nachdem die Aufklärung der Promotor- und Genstruktur des Kaninchen-*TPT1*-Gens vollständig, und des humanen Gens vorläufig erfolgte, sind die primären Voraussetzungen für weitergehende Experimente geschaffen worden. Die funktionellen Promotoranalysen, der Promotorvergleich zwischen Mensch und Kaninchen und die Herstellung von induktiven Zusammenhängen haben die Eingrenzung von potentiellen TF-Bindungsstellen über das wahrscheinliche Maß reiner Sequenzanalysen hinaus deutlich erhöht. Vor diesem Hintergrund sollte es möglich sein, gezielter nach funktionellen Aspekten zu suchen. Dazu gehören Reporter-gen-Analysen, welche die Bedeutung einzelner Faktoren durch gezielte Mutation von cis-Motiven untersuchen. DNA-“Foot print” Analysen sind weitere etablierte Verfahren um cis/trans-Wechselwirkungen aufzudecken. Das Prinzip dieser Untersuchung besteht in der Maskierung von DNA-Bereichen durch Bindung von TF. Eine nachfolgende Sequenzierreaktion wird durch diese cis/trans-Aggregate gestört, und hinterläßt Aussparungen im Sequenzgel. Somit kann der Bindungsbereich der Proteine dargestellt werden. UV-Vernetzungsexperimente sind dann in der Lage die Molekulargewichte der bindenden Proteine näher zu charakterisieren. Andere Möglichkeiten der weiteren TF-Untersuchungen

bieten sich durch gezielten Einsatz von Induktoren bzw. Hemmstoffen der *TPT1*-Expression an. In Verbindung von Transfektionen mit Reportergenkonstrukten, die die vermuteten cis-Elemente enthalten, ließen sich sowohl die Faktoren identifizieren als auch ihre Beteiligung an der vermuteten PKC-gekoppelten Induktion überprüfen. Die genauere Untersuchung der intrazellulären “second-messenger”-vermittelten Signalwege sollte weitere Aussagen über die beteiligten TF geben, da sie Substrate von verschiedenen Kinasen sind, durch die sie aktiviert oder inaktiviert werden. Dazu gehören z.B. PKC, diverse MAP-Kinasen, Januskinase oder PKA. Viele dieser Kinasen und ihre Isoformen sind durch spezifische Induktoren bzw. Hemmstoffe beeinflussbar. Deren Auswirkungen könnten in Transfektionsexperimenten beobachtet werden. Als weitere Möglichkeit bietet sich die gezielte Ausschaltung einzelner TF unter Beibehaltung der cis-Elemente an. Dies ist durch den Einsatz neutralisierender Antikörper oder “antisense” RNA realisierbar.

Die Untersuchung der posttranskriptionellen Regulation der Synthese des Kaninchen TCTP war wegen der unvollständig aufgeklärten mRNA-Strukturen bislang nur eingeschränkt möglich. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit läßt sich dies nunmehr realisieren. Dazu bieten sich zellfreie Transkriptions-/Translationssysteme in Verbindung mit dem Einsatz verschiedener cDNA-Konstrukte an, denen Motive der 5'UTR bzw. 3'UTRs fehlen. UV-Vernetzungsexperimente (“UV-cross-linking”), Gel-Verzögerungsexperimente (“gel-shifts”) sowie RNA-Affinitätschromatographie-Techniken können zur Identifizierung und Isolierung eventuell involvierter Proteinfaktoren beitragen.

Viele offene Fragen zur Funktion des Proteins TCTP, welche im Bereich des Zytoskeletts der Zellen vermutet wird, sind noch zu beantworten. Von medizinischer Seite ist es wichtig zu klären, ob TCTP in die Pathogenese von Krankheiten involviert ist. Dazu gehört es, die Funktion des Proteins als Histaminfreisetzungsfaktor bei Atopikern aufzuklären.

Aus der Beobachtung, daß *TPT1*-knock-out-Varianten der Hefe lebensfähig waren und nur strukturelle Veränderungen zeigten, läßt sich die mögliche Existenz von genetischen Erkrankungen ableiten, die mit einer mutierten *TPT1*-Genstruktur einhergehen. Die Kartierung des humanen *TPT1*-Gens auf Chromosom 13q14.2-21.1 korreliert mit Tumoren bei chronisch lymphatischen Leukämien (Kalachikov et al. 1997). Einige der Tumoren die mit Deletionen in

diesem chromosomalen Bereich einhergehen zeigen auffällige strukturelle Veränderungen. Aus diesen Befunden läßt sich einerseits das Vorhandensein eines Tumorsuppressorgens ableiten. Andererseits unterstützt dies die These der Lebensfähigkeit von Zellen mit mutiertem oder fehlendem TCTP. Die Suche nach Tumorklonen mit homozygoten Deletionen auf Chromosom 13q14 würde eine interessante Alternative zu „knock outs“ ergeben und als Zellmodell zum Studium der Funktion des TCTP vielfältig eingesetzt werden können. Kürzlich wurde die Nichtdetektierbarkeit von TCTP in einem Nierentumor beschrieben (**Sanchez et al. 1997a**). Hierbei könnte es sich um einen entsprechenden Tumor mit einer Deletion des *TPT1*-Gens handeln.

Bei der Suche und der Beschäftigung mit dem *TPT1*-Gen des Kaninchens und des Menschen waren immer wieder die Auswirkungen des humanen Genomprojektes spürbar. War die Suche nach dem Kaninchengen noch sehr zeitintensiv, gestaltete sich diese beim Menschen durch die kommerziellen genomischen Banken viel schneller. Zwei humane *TPT1*-Pseudogene konnten durch einfache Suche in Sequenzdatenbanken identifiziert werden. In naher Zukunft werden die vollständige genomische Sequenz des Menschen sowie anderer Organismen, und mit ihr alle Gene und Proteine bekannt sein. Die Beschäftigung mit den noch zu tausenden zu entdeckenden Genen, und der daraus resultierenden Beschleunigung des medizinischen und molekularbiologischen Fortschritts wird immens sein und ist derzeit noch nicht abschätzbar. Man kann damit rechnen, daß bald die meisten Krankheiten auf ihre molekularen Ursachen zurückgeführt werden können. Damit sind die Voraussetzungen für kausale Therapieansätze gegeben. Auch die Erforschung der transkriptionellen Regulation von Genen dürfte von dem Wissenszuwachs profitieren. Schon jetzt ist klar, daß ein erheblicher Teil der genomischen Kapazität für TF kodiert. Dies äußert sich eindrucksvoll in der ständig wachsenden Liste entdeckter TF (Mai 1998 - 2376 Faktoren). Bald wird es eine finale Liste von TF geben und die Erforschung von transkriptionellen Zusammenhängen wird systematisch möglich sein. Die gezielte Beeinflussung der Expression auf der Ebene der Transkription ist für die Zukunft ein sehr interessantes medizinisches Konzept. Die nach diesem Prinzip wirkenden Glukokortikoide haben sich z.B. als sehr effektiv für die Behandlung von vielen Erkrankungen, speziell des rheumatischen Formenkreises erwiesen.

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die bisher unbekannte, vollständige Struktur des Gens für das translationell kontrollierte Tumorprotein (TCTP) bei Mensch und Kaninchen und legt erstmals funktionelle Daten zur Kontrolle seiner Transkription vor.

Der Name des Proteins geht auf seine erstmalige Beschreibung in Tumorzellen zurück, sowie auf Besonderheiten seiner spezifisch auf der Translationsebene kontrollierten Synthese. Entsprechend der „human genome database“ Nomenklatur wird das Gen, das für TCTP kodiert, mit *TPT1* bezeichnet.

TCTP ist ein ubiquitär im Tier- und Pflanzenreich verbreitetes Protein mit bisher nicht genau bekannter physiologischer und molekularer Funktion. Bindungsstudien sowie Untersuchungen zu seiner intrazellulären Lokalisation haben gezeigt, daß es im Bereich des Zytoskeletts stark vom Zellzyklus abhängig an Tubulin bindet, sowie eine hohe Affinität zu Kalzium-Ionen hat. Von besonderem medizinischen Interesse ist die Eigenschaft des TCTP, als Histamin freisetzender Faktor (histamine releasing factor=HFR) wirken zu können. Die basophilen Leukozyten vieler atopischer Kinder mit Hautekzemen und Nahrungsmittelunverträglichkeiten reagierten auf TCTP mit einer IgE-abhängigen Histaminausschüttung. Damit könnte sich das Protein als ein Schlüssel zum Verständnis der in Industriestaaten zunehmend wichtiger werdenden allergischen Erkrankungen erweisen.

Grundlage für das Verständnis der Synthese eines Proteins sind Kenntnisse über Struktur und Regulation der Expression seines Gens. Die Expression eines Gens wird hauptsächlich auf der Transkriptionsebene determiniert. Aber auch posttranskriptionelle Regulationsprozesse auf der mRNA- und Proteinebene können von Bedeutung sein. Es war bekannt, daß Stimulatoren der Genexpression wie Phorbolester (TPA), Lipopolysaccharide (LPS), Interleukine (IL-3), Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Schwermetalle zu einer Induktion der TCTP-Synthese führen. Dies sprach für eine starke Beteiligung der Kontrollebene der Transkription.

Da die Promotor- und Genstrukturen bisher von keiner Spezies bekannt waren, mußten diese zunächst aufgeklärt werden. Dazu wurde das Human- und ein Tiermodell (Kaninchen) gewählt. Am Beginn wurden genomische Rekombinanten des Kaninchen-Gens isoliert und sequenziert.

Vergleiche mit cDNA-Sequenzen ergaben die vollständige Genstruktur. Das relativ kleine Gen von 3819 Nukleotiden Länge erwies sich als typisch für Eukaryonten. Es umfaßt sechs Exons (144 bp, 74 bp, 191 bp, 106 bp, 117 bp, 531 bp), die von fünf Introns unterbrochen werden (220 bp, 503 bp, 331 bp, 746 bp, 856 bp). Das Gen kodiert für zwei verschiedene mRNAs von 843 nt und 1163 Nukleotiden Länge, die sich durch Verwendung alternativer Polyadenylierungssignale nur in der Länge der 3'-untranslatierten Sequenzen (3'UTR) unterscheiden. Beide mRNAs konnten aus einer cDNA Bank isoliert und ihre Struktur vollständig aufgeklärt werden. Weiterhin wurden 1,2 kb der 5'-flankierenden Region des Gens sequenziert, die die wesentlichen Promotorstrukturen enthält.

Nach der Analyse des Kaninchen *TPT1*-Gens wurde auch die Struktur des Human-Gens vollständig aufgeklärt. Während der Arbeiten am Kaninchen-Gen wurde eine 3'-terminale Teilsequenz des Human-Gens publiziert, die jedoch nur etwa einem Drittel seiner Gesamtlänge entsprach und auch keine Promotorstrukturen enthielt. Deshalb wurde der Versuch unternommen, die Struktur des Human-Gens zu vervollständigen. Es wurde eine genomische Rekombinante aus einer Human-Bank isoliert, die das komplette Gen enthielt. Es wurde vollständig sequenziert, einschließlich 0,5 kb seiner Promotorregion. Das Human-Gen ist 4259 Nukleotide lang, besitzt eine identische Intron/Exon Architektur wie das Kaninchen-Gen und wird ebenfalls in zwei mRNAs transkribiert, die sich in der Struktur ihrer 3'-UTR unterscheiden.

Die Transkriptionskontrolle vieler Gene spiegelt sich häufig in unterschiedlicher Genaktivität in verschiedenen Geweben wider. Dies läßt sich durch Quantifizierung der gebildeten mRNA-Menge untersuchen. Das Ausmaß der Transkription des *TPT1*-Gens in den verschiedenen Geweben von Mensch und Kaninchen wurde mittels Northern- und RNA Dotblot-Analysen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß beide mRNAs in allen untersuchten Geweben von Mensch (50) und Kaninchen (10) transkribiert werden, aber mit großen quantitativen Unterschieden. Die Expressionsstärke unterschied sich bis zum Faktor 100 zwischen stark exprimierenden Geweben, wie glatten Muskelzellen, und schwach exprimierenden, wie Geweben des ZNS. Dies spricht für eine ausgeprägte Transkriptionskontrolle unter der Mitwirkung gewebsspezifischer Faktoren.

Die Verfügbarkeit der Sequenzen der Promotorregionen des Kaninchen- als auch des Human-Gens machte es möglich, eine Computeranalyse von möglichen Bindungsstellen für

Transkriptionsfaktoren zu erstellen und diese mit einer vergleichenden Betrachtung konservierter Sequenzregionen zu verbinden. Denn häufig sind bedeutsame Bindungsregionen zwischen den Spezies evolutionär konserviert und der Wert der Vorhersage erhöht sich damit beträchtlich. Die ersten 160 bp beider Promotoren erwiesen sich als zu 89% homolog, und alle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (TF) sind in diesem Bereich konserviert. Dazu gehören zwei TF aus den Familien CREB/AP-1, zwei ETS-1 Faktoren, ein SP-1 Faktor und ein MZF-1 Faktor. Die in ihrer Homologie stark nachlassenden stromaufwärtsliegenden Promotorsequenzen haben noch konservierte Bindungsstellen für die Faktoren NF-1, MZF-1 und STAT-1.

Um funktionelle Aussagen über die Transkriptionseffizienz des Kaninchenpromotors zu erhalten, wurden CAT-Assays durchgeführt. Dazu wurde der Promotor fragmentiert, an ein *cat*-Reportergen gekoppelt und nach transienter Transfektion in glatte Muskelzellen die Promotorstärke der einzelnen Teile durch Messung der CAT-Enzymaktivität ermittelt. Ein minimales Promotormotiv läßt sich auf 66 bp eingrenzen. Hier befinden sich eine TATA-Box und die Bindungsorte für einen CREB/AP-1 und einen MZF-1 Faktor. Innerhalb von 166 bp konnte kein weiterer Anstieg der Aktivität gemessen werden. Die Faktoren, die in diesem Bereich binden könnten sind zwei ETS-1, ein CREB/AP-1 und ein SP-1. Einen sprunghaften Anstieg der Aktivität bis 90% gegenüber dem zur Kontrolle verwendeten starken Thymidinkinasepromotor des HSV1-Virus verzeichnet das nächst größere Fragment von 291 bp. Im Kaninchengen kommen hier zwei NF-1 und eine MZF-1 Bindungsstelle, im Human-Gen ein NF-1-Ort in entgegengesetzter Orientierung, ein SP-1 und ein MZF-1 Ort vor. Alle größeren Promotorfragmente fallen in ihrer Aktivität wieder leicht (70-80%) ab, was auf die Anwesenheit eines Transkriptions-Silencers hindeutet. Hier ist vor allem eine konservierte Bindungsstelle für STAT-1 zu erwähnen.

Das gemeinsame Merkmal beider Promotoren ist die Häufung von Bindungsstellen für TF im Bereich der stark konservierten 160 bp proximal zum Transkriptionsinitiationsort, die man als Protooncogene in vielen wachstumsregulierten Genen findet. Dazu gehören ETS-1 und CREB/AP-1. Eine besondere Eigenschaft der CREB/AP-1 Familien, zu denen z.B. CREB1, CRE-BP1, c-Jun und c-Fos gehören, ist die Fähigkeit, als einer der Kreuzungspunkte der intrazellulären Signalwege (Proteinkinase A und Proteinkinase C) auf extrazelluläre Stimuli zu reagieren. Die Bindungsstelle für AP-1 wird auch Phorbol ester (TPA)-responsibles Element



(TRE) genannt, da Phorbolester bekanntermaßen zur Aktivierung der TF c-Jun und c-Fos führen. Auch Lipopolysaccharide greifen in diese Signaltransduktionsprozesse ein. Dies würde erklären, wie es zur Aktivierung des *TPT1*-Gens durch diese Substanzen kommt.

Southernblot-Analysen konnten eine Vielzahl von Sequenzelementen in genomischer Kaninchen DNA nachweisen, die neben dem aktiven *TPT1*-Gen mit *TPT1*-Sonden hybridisieren. Als Ursache für diese komplexe Verteilung *TPT1*-homologer Elemente im Kaninchengenom konnten intronlose prozessierte *TPT1*-Pseudogene identifiziert werden. Da dieses Phänomen sowohl bei der Maus als auch beim Menschen nachweisbar ist, kann man hier von einer speziesübergreifenden Besonderheit des *TPT1*-Gens ausgehen. Aus einer genomischen Bank wurden Rekombinanten der Pseudogene isoliert. Von insgesamt über 30 Primärklonen wurden 13 näher charakterisiert und sechs Pseudogene vollständig sequenziert. Von diesen sechs Klonen enthielten vier unterschiedliche Pseudogene mit unterschiedlicher Struktur und unterschiedlichen flankierenden genomischen Integrationssequenzen. Die Pseudogene *TPT1*-ps1 und *TPT1*-ps2 sind Abkömmlinge der kurzen TCTP-mRNA1, während die Klone *TPT1*-ps3 und *TPT1*-ps4 die lange TCTP-mRNA2 repräsentieren. Alle Pseudogene sind zu über 98% homolog zur korrespondierenden mRNA, haben keine, bzw. keine gravierenden Aminosäureaustausche und besitzen alle einen offenen Leserahmen. Um eine mögliche Promotor-Aktivität und damit Exprimierbarkeit der Pseudogene zu untersuchen, wurden analog zum aktiven *TPT1*-Gen CAT-Assays mit klonierten 5'-flankierenden Fragmenten der Pseudogene durchgeführt. Das Pseudogen *TPT1*-ps4 zeigte hierbei eine Aktivität, die mit der basalen Promotorstärke des *TPT1*-Gens vergleichbar war. Das Pseudogen *TPT1*-ps2 hatte eine etwa halb so große Aktivität. Ob diese Pseudogene eine biologische Relevanz besitzen und sie in vivo exprimiert werden ist jedoch ungeklärt.

## Literaturverzeichnis

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1995) Molekularbiologie der Zelle. 3.Auflage, Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo, VCH, 1995
- Andersson G (1977) Accumulation of polyploid cells and G2-phase cells during ascites tumor growth. *J. Cell Physiol.* 90(2): 329-335
- Arias J, Alberts AS, Brindle P, Claret FX, Smeal T, Karin M, Feramisco J, Montminy M (1994) Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 370(6486): 226-229
- Avni D, Shama S, Loreni F, Meyuhas O (1994) Vertebrate mRNAs with a 5'-terminal pyrimidine tract are candidates for translational repression in quiescent cells: Characterisation of the cis-regulatory element *Mol. Cell. Biol.* 14(6): 3822-3833
- Bassuk AG, Leiden JM (1995) A direct physical association between ETS and AP-1 transcription factors in normal human T cells. *Immunity* 3(2): 223-237
- Benbrook DM, Jones NC (1990) Heterodimer formation between CREB and Jun proteins. *Oncogene* 5(3): 295-302
- Benham FJ, Hodgkinson S, Davis KE (1984) A glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase pseudogene on the short arm of the human X chromosome defines a multigene family. *EMBO J.* 3: 2635-2640
- Benndorf R, Nürnberg P, Bielka H (1988) Growth phase-dependent proteins of the Ehrlich Ascites Tumor analyzed by one- and two-dimensional electrophoresis. *Exp. Cell Res.* 174: 130-138
- Berger M, Schwarz K, Thiele H, Reimann I, Huth A, Borngräber S, Kühn H, Thiele BJ (1998) Simultaneous expression of leukocyte-type 12-lipoxygenase and reticulocyte-type 15-lipoxygenase in rabbits. *J. Mol. Biol.* 278: 935-948
- Bergot MO, Diaz-Guerra MJM, Puzenat N, Raymondjean M, Kahn A (1992) Cis-regulation of the L-type pyruvate kinase gene promoter by glucose, insulin and cyclic AMP. *Nucleic Acids Res.* 20: 1871-1878
- Bernstein LB, Mount SM, Weiner AM (1983) Pseudogenes for human small nuclear RNA U3 appear to arise by integration of self-primed reverse transcripts of the RNA into new chromosomal sites. *Cell* 32: 461-472
- Bernstein LR, Ferris DK, Colburn NH, Sobel ME (1994) A family of mitogen-activated protein kinase-related proteins interacts in vivo with activator protein-1 transcription factor. *J. Biol. Chem.* 269(13): 9401-9404
- Bhisutthibhan J, Pan XQ, Hossler PA, Walker DJ, Yowell CA, Carlton J, Dame JB, Meshnick SR (1998) The Plasmodium falciparum translationally controlled tumor protein and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *J. Biol. Chem.* 273: 16192-16198
- Bini L, Heid H, Liberatori S, Geier G, Pallini V, Zwillig R (1997) Two-dimensional gel electrophoresis of Caenorhabditis elegans homogenates and identification of protein spots by microsequencing. *Electrophoresis* 18: 557-562

- Böhm H, Gross B, Gaestel M, Bommer UA, Ryffel G, Bielka H **(1991)** The 5'-untranslated region of p23 mRNA from the Ehrlich ascites tumor is involved in translation control of the growth related protein p23. *Biomed. Biochim. Acta* 50: 1193-1203
- Böhm, H, Benndorf R, Gaestel M, Gross B, Nürnberg P, Kraft R, Otto A, Bielka H **(1989)** The growth-related protein p23 of the Ehrlich ascites tumor: Translational control, cloning and primary structure. *Biochem. Int.* 19: 277-286
- Bommer UA, Lazaris-Karatzas A, De Benedetti A, Nürnberg P, Benndorf R, Bielka H, Sonenberg N **(1994)** Translational regulation of the mammalian growth-related protein p23: Involvement of eIF-4E. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40: 633-641
- Bonaldo M, Jelenc P, Su Lee Lawten L, Yu MT, Warburton D, Soares MB **(1996)** Identification and characterization of three genes and two pseudogenes on chromosome 13. *Hum. Genet.* 97: 441-452
- Britten RJ, Kohne DE **(1968)** Repeated sequences in DNA. *Science* 161: 529-540
- Brown TA **(1999)** Genomes. 1. Auflage, BIOS Scientific Publishers Ltd, Bath Press Ltd, Bath, UK, 1999
- Cameron **(1979)** Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell* 16(4): 739-751
- Cayanis E et al. **(1998)** High-resolution YAC-cosmid-STS map of human chromosome 13. *Genomics* 47: 26-43
- Chien YH, Dawid IB **(1984)** ) Isolation and characterization of calmodulin genes from *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* 4: 507-513
- Chitpatima ST, Makrides S, Bandyopadhyay R, Brawerman G **(1988)** Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucl. Acids Res.* 16: 2350
- Coen ES ,Carpenter R **(1986)** Transposable elements in *Antirrhinum majus* - generators of genetic diversity. *Trends Genet.* 2: 292-296
- Cooke RA, Vander-Veer A **(1916)** Human sensitization. *J. Immunol.* 1: 201
- Dahia PL, FitzGerald MG, Zhang X, Marsh DJ, Zhang Z, Pietsch T, von Deimling A, Haluska FG, Haber DA, Eng C **(1998)** A highly conserved processed PTEN pseudogene is located on chromosome band 9p21. *Oncogene.* 16(18): 2403-2406
- Daniels CJ, Gupta R, Doolittle WF **(1985)** Transcription and excision of a large intron in the tRNA TRP gene of an archaebacterium, *Halobacterium volcanii*. *J. Biol. Chem.* 260(5): 3132-3134
- Decker CJ, Parker R **(1995)** Diversity of cytoplasmic functions for the 3' untranslated region of eukaryotic transcripts. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 386-392
- Denhardt DT, Edwards DR, Parfett CL **(1986)** Gene expression during the mammalian cell cycle. *Biochim Biophys Acta* 865: 83-125

- Devor EJ, Dill-Devor RM, Magee HJ, Waziri R **(1998)** Serine hydroxymethyltransferase pseudogene, SHMT-ps1: a unique genetic marker of the order primates. *J. Exp. Zool.* 282(1-2): 150-156
- DiNocera PP, Dawid IB **(1983)** Interdigitated arrangement of two oligoA terminated DNA sequences in *Drosophila*. *Nucl. Acids Res.* 11: 5475-5482
- Durkin JP, Chakravarthy B, Tremblay R, Jouishomme H, Whitfield JF, Biquard JM, Krsmanovic V **(1992)** Evidence that a novel human differentiation-inhibiting protein blocks the dimethyl sulfoxide-induced differentiation of erythroleukemia cells by inhibiting the activation of membrane protein kinase C. *Cancer Res.* 52(22): 6329-6334
- Epner DE, Herschmann HR **(1991)** Heavy metals induce expression of the TPA-inducible sequence (TIS) genes. *J. Cell. Physiol.* 148(1): 68-74
- Ferreri K, Gill G, Montminy M **(1994)** The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1210-1213
- Fink JS, Verhaves M, Walton K, Mandel G, Goodman RH **(1991)** Cyclic cAMP - and Phorbol-ester-induced transcriptional activation are mediated by the same enhancer element in the human vasoactive intestinal peptide gene. *J. Biol. Chem.* 266(6): 3882-3887
- Frytag SO, Bock HGO, Beaudet AL, O'Brien WE **(1984)** Molecular structures of human argininosuccinate synthetase pseudogenes. *J. Biol. Chem.* 259: 3160-3166
- Gachet Y, Tournier S, Lee M, Lazaris-Karatzas A, Poulton T, Bommer UA **(1999)** The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J. Cell Science*, im Druck
- Garrigos M, Deschamps S, Viel A, Lund S, Champeil P, Moller JV, le Mair M **(1991)** Detection of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins by electrophoretic migration in the presence of Ca<sup>2+</sup> combined with <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> overlay of protein blots. *Anal. Biochem.* 194: 82-88
- Gill G, Pascal E, Tseng ZH, Tjian R **(1994)** A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the *Drosophila* TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 192-196
- Gorman C, Moffat LF, Howard BH **(1982)** Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2: 1044-1051
- Gross B, Gaestel M, Böhm H, Bielka H **(1989)** cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor protein. *Nucl. Acids Res.* 17: 8367
- Haghighat NG, Ruben L **(1992)** Purification of novel calcium binding proteins from *Trypanosoma brucei* : properties of 22-, 24- and 38-kilodalton proteins. *Mol. Biochem. Parasit.* 51: 99-110
- Hai T, Curran T **(1991)** Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(9): 3720-3724

- Hambleton J, McMahon M, DeFranco AL **(1995)** Activation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinase in murine macrophages partially mimics Lipopolysaccharide-induced signaling events. *J. Exp. Med.* 182: 147-154
- Horvai AE, Xu L, Korzus E, Brard G, Kalafus D, Mullen TM, Rose DW, Rosenfeld MG, Glass CK **(1997)** Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(4): 1074-1079
- Hromas R, Collins SJ, Hickstein D, Raskind W, Deaven LL, O'Hara P, Hagen FS, Kaushansky K **(1991)** A retinoic acid-responsible human zinc finger gene, MZF-1, preferentially expressed in myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 266(22): 14183-14187
- Hughes GJ, Frutiger S, Paquet N, Pasquali C, Sanchez JC, Tissot JD, Bairoch A, Appel RD, Hochstrasser DF **(1993)** Human liver protein map: Update 1993. *Electrophoresis* 14: 1216-1222
- Hultberg B, Andersson A, Isaksson A **(1997)** Copper ions differ from other thiol reactive metal ions in their effects on the concentration and redox status of thiols in HeLa cell cultures. *Toxicology* 117(2-3): 89-97
- Jacq C, Miller JR, Brownlee GG **(1977)** A pseudogene in 5S DNA of *Xenopus laevis*. *Cell* 13: 109-120
- Jefferies HBJ, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G **(1994)** Rapamycin selectively repress translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4441-4445
- Jeffreys J, Harris S **(1984)** Pseudogenes. *BioEssays* 1: 253-258
- Jeong Y, Won J, Yim J **(1998)** Cloning and structure of a rabbit protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN) gene and its pseudogene. *Gene* 214(1-2): 67-75
- John B, Miklos GLG **(1979)** Funktional aspects of satellite and heterochromatin. *Int. Rev. Cytol.* 58: 1-114
- Kalachikov S et al. **(1997)** Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics* 42: 369-377
- Kara CJ, Liou HC, Ivashkiv LB, Glimcher LH **(1990)** A cDNA for a human cyclic AMP response element-binding protein which is distinct from CREB and expressed preferentially in brain. *Mol. Cell. Biol.* 10(4): 1347-1357
- Kazazian HH Jr, Wrong C, Youssufian H, Scott AF, Phillips DG, Antonarakis SE **(1988)** Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature London* 332: 164-166
- Klebanoff SJ, Mehlin C, Headley CM **(1997)** Activation of the HIV type 1 long terminal repeat and viral replication by dimethylsulfoxide and related solvents. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13(14): 1221-1227
- Kleine-Tebbe J, Kagey-Sobotka A, MacGlashan DW, Lichtenstein LM, MacDonald SM **(1996)** Lectins do not distinguish between heterogeneous IgE molecules as defined by differential activity of an IgE dependent histamine releasing factor. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98(1): 181-188
- Kramer M und Coen DM **(1995)** Current Protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc.

- Kuo ML, Lee KC, Lin JK, Huang TS (1995) Pronounced activation of protein kinase C, ornithine decarboxylase and c-jun proto-oncogene by paraquat-generated active oxygen species in WI-38 human lung cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1268(2): 229-236
- Kuo ML, Lee KC, Lin JK, Huang TS (1995) Pronounced activation of protein kinase C, ornithine decarboxylase and c-jun proto-oncogene by paraquat-generated active oxygen species in WI-38 human lung cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1268(2): 229-236
- Kwok RPS, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bächinger HP, Brennan RG, Roberts SGE, Grenn MR, Goodman RH (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370: 223-226
- Lee SF, Huang YT, Wu WS, Lin JK (1996) Induction of c-jun protooncogene expression by hydrogen peroxide through hydroxyl radical generation and p60SRC tyrosine kinase activation. *Free Radic. Biol. Med.* 21(4): 437-478
- Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds G, Gitschier J (1990) A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics* 7(1): 1-11
- Levy S, Avni D, Hariharan N, Perry RP, Meyuhas O (1991) Oligopyrimidine tract at the 5' end of mammalian ribosomal protein mRNAs is required for their translational control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3319-3323
- Linbach KJ, Wu R (1985) Characterisation of a mouse somatic cytochrome c gene and three cytochrome c pseudogenes. *Nucl. Acids Res.* 13: 617-630
- Look DC, Pelletier MR, Tidwell RM, Roswit WT, Holtzman MJ (1995) Stat1 depends on transcriptional synergy with Sp1. *J. Biol. Chem.* 270(51): 30264-30267
- Luckow B, Schütz G (1987) CAT construction with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eucaryotic promoters and regulatory elements. *Nucl. Acids Res.* 15: 5490
- MacDonald S, Rafnar T, Langdon J, Lichtenstein L (1995) Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* 269: 688-690
- Majerus MA, Bibollet-Ruche F, Telliez JB, Wasylyk B, Bailleul B (1992) Serum, AP-1 and Ets-1 stimulate the human ets-1 promoter. *Nucl. Acids Res.* 20(11): 2699-2703
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989) Molecular Cloning - A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory
- Mastrangelo IA, Courey AJ, Wall JS, Jackson SP, Hough PVC (1991) DNA looping and SP1 multimer links: A mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5670-5674
- Mazarakis N, Michalovich D, Karis A, Groveld F, Galjart N (1996) Zfp-37 is a member of the KRAB zinc finger gene family and is expressed in neurons of the developing and adult CNS. *Genomics* 33(2): 247-254
- Miyamoto S, Chiorini JA, Urcalay E, Safer B (1996) Regulation of gene expression for translation initiation factor eLF-2 alpha: importance of the 3' untranslated region. *Biochem. J.* 315(Pt 3): 791-798

- Morris JF, Hromas R, Rauscher III FJ (1994) Characterisation of the DNA-binding properties of the myeloid zinc finger protein MZF-1: Two independent DNA-binding domains recognize two DNA consensus sequences with a common G-rich core. *Mol. Cell. Biol.* 14(3): 1786-1795
- Morse B, Rotherg PG, South VJ, Spandorfer JM, Astrin SM (1988) Insertional mutagenesis of the myc locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma. *Nature London* 333(6168): 87-90
- Mufson RA, Szabo J, Eckert D (1992) Human IL-3 induction of c-jun in normal monocytes is independent of tyrosine kinase and involves protein kinase C. *J. Immunol.* 148(4): 1129-1135
- Nan X, Cross S, Bird A (1998) Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins. *Novartis Found Symp* 214:6-16: 16-21, 46-50
- Nasser G, Haghighat, Ruben L (1992) Purification of novel calcium binding proteins from *Trypanosoma brucei*: properties of 22-, 24- and 38-kilodalton proteins. *Elektrophoresis* 13: 99-110
- Newberry EP, Willis D, Latifi T, Boudreaux JM, Towler DA (1997) Fibroblast growth factor receptor signaling activates the human interstitial collagenase promoter via the bipartite Ets-AP1 element. *Mol. Endocrinol.* 11(8): 1129-1144
- Nielsen HV, Johnsen AH, Sanchez JC, Hochstrasser DF, Schiotz PO (1998) Identification of a basophil leukocyte interleukin-3-regulated protein that is identical to IgE-dependent histamin-releasing factor. *Allergy* 53: 6452-652
- Noti JD, Reinemann C, Petrus MN (1996) Regulation of the leukocyte integrin gene CD11c is mediated by AP1 and Ets transcription factors. *Mol. Immunol.* 33(2): 115-1127
- O'Kane CJ, Gehring WJ (1980) Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9123-9127
- Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Wilm M, Thiele BJ, Mann M, Hentze MW (1997) mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase mRNA translation from the 3' end. *Cell* 89: 597-606
- Pay A, Heberle-Bors E, Hirt H (1992) An alfalfa cDNA encodes a protein with homology to translationally controlled human tumor protein. *Plant Molec. Biol.* 19: 501-503
- Quandt K, French K, Karas H, Wingender E, Werner T (1995) MatInd and MatInspector - New fast and versatile tool for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucl. Acids Res.* 23: 4878-4884
- Quinn PG (1993) Distinct activation domains within cAMP response element-binding protein (CREB) mediate basal and cAMP-stimulated transcription. *J. Biol. Chem.* 268: 16999-17009
- Rajanna B, Chetty CS, Rajanna S, Hall E, Fail S, Yallapragada PR (1995) Modulation of protein kinase C by heavy metals. *Toxicol. Lett.* 81(2-3): 197-203
- Renaudie F, Yachou AK, Grandchamp B, Jones R, Beaumont C (1992) A second ferritin L subunit is encoded by an intronless gene in the mouse. *Mamm. Genome* 2(3): 143-149

- Rogers JH **(1985)** The origin and evolution of retroposons. *Int. Rev. Cytol.* 93: 187-279
- Ruis H, Schuller C **(1995)** Stress signaling in yeast. *Bioessays* 17(11): 959-1995
- Sage-Ono K, Ono M, Harada H, Kamada H **(1998)** Dark-induced accumulation of mRNA for a homolog of translationally controlled tumor protein (TCTP) in Pharbitis. *Plant Cell Physiol.* 39: 357-360
- Sakurai A, Maekawa T, Sudo T, Ishii S, Kishimoto A **(1991)** Phosphorylation of cAMP response element-binding protein CRE-BP1, by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181(2): 629-635
- Sampson HA, Broadbent KR, Broadbent JB **(1989)** Spontaneous release of histamin from basophils and histamin-releasing factor in patients with atopic dermatitis and food hypersensitivity. *N. Eng. J. Med.* 321: 228-232
- Sanchez JC, Schaller D, Ravier F, Golaz O, Jaccoud S, Belet M, Wilkins MR, James R, Deshusses J, Hochstrasser D **(1997)** Translationally controlled tumor protein: A protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes. *Electrophoresis* 18: 150-155
- Sanchez JC, Wirth P, Jaccoud S, Appel RD, Sarto C, Wilkins MR, Hochstrasser DF **(1997)** Simultaneous analysis of cyclin and oncogene expression using multiple monoclonal antibody immunoblots. *Electrophoresis* 18: 638-641
- Scheper W, Meinsma D, Holthuizen PE, Sussenbach JS **(1995)** Long-range RNA interaction of two sequence elements required for endonucleolytic cleavage of human insulin-like growth factor II mRNAs. *Moll. Cell Biol.* 15: 235-245
- Schroeder JT, Lichtenstein LM, MacDonald SM **(1996)** An immunoglobulin E-dependent recombinant histamin-releasing factor induces interleukin-4 secretion from human basophils. *J. Exp. Med.* 183: 1265-1270
- Seed B, Sheen JY **(1988)** A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acetyltransferase activity. *Gene* 67: 271-277
- Severson WE, Mascolo PL, White MW **(1995)** Lymphocyte p56L32 is a RNA/DNA-binding protein which interacts with conserved elements of the murine L32 ribosomal protein mRNA. *Eur. J. Biochem.* 229: 426-432
- Shama S, Meyuhas O **(1996)** The translational cis-regulatory element of mammalian ribosomal protein mRNA is recognized by the plant translational apparatus. *Eur. J. Biochem.* 236: 383-388
- Smith GP **(1976)** Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* 191: 528-535
- Southern EM **(1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517
- Speizer LA, Watson MJ, Kanter JR, Brunton LL **(1989)** Inhibition of phorbol ester binding and protein kinase C activity by heavy metals. *J. Biol. Chem.* 264(10): 5581-5585



- Stamatoyannopoulos JA, Clegg CH, Li Q (1997) Sheltering of gamma globin expression from position effects requires both an upstream control region and a regulatory element 3' to the A gamma-globin gene. *Mol. Cell Biol.* 17(1): 240-247
- Stein JP, Munjaal RP, Lagace L, Lai EC, O'Malley BW, Means AR (1983) Tissue-specific expression of a chicken calmodulin pseudogene lacking intervening sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80(21): 6485-6489
- Sturzenbaum SR, Kille P, Morgan AJ (1998) Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus*1. *Biochim Biophys Acta* 1398: 294-304
- Su TS, Nussbaum RL, Airhart S, Ledbetter DH, Mohandas T, O'Brien WE, Beaudet AL (1984) Human chromosomal assignments for 14 argininosuccinate synthetase pseudogenes: cloned DNAs as reagents for cytogenetic analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 36: 954-964
- Sun D, Elsea SH, Patel PI, Funk CD (1998) Cloning of a human "epidermal-type" 12-lipoxygenase-related gene and chromosomal localization to 17p13. *Cytogenet Cell Genet* 81(1): 79-82
- Sun Z, Means AR (1995) An intron facilitates activation of the caldesmon gene by the testis-specific transcription factor CREM tau. *J. Biol. Chem.* 270(36): 20962-20967
- Swanek JL, Cobb MH, Geppert TD (1997) Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol. Cell. Biol.* 17(11): 6274-6282
- Tate PH, Bird AP (1993) Effects on DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 226-231
- Tazi J, Bird A (1990) Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell* 60: 909-920
- Thiele BJ, Berger M, Huth A, Reimann I, Schwarz K, Thiele H (1999) Tissue-specific translational regulation of alternative rabbit 15-lipoxygenase mRNAs differing in their 3'-untranslated regions. *Nucl. Acids Res.* 27(8): 1828-1836
- Thomas G, Thomas G (1986) Translational control of mRNA expression during the early mitogenic response in Swiss mouse 3T3 cells: Identification of specific proteins. *J. Cell Biol.* 103: 2137-2144
- Thomas G, Thomas G, Luther H (1981) Transcriptional and translational control of cytoplasmic proteins after stimulation of quiescent Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5712-5716
- Trubiani O, Rapino M, Pieri C, Di Primio R (1998) Phorbol ester synergizes the dimethyl sulfoxide-dependent programmed cell death through diacylglycerol increment. *Cancer Detect. Prev.* 22(5): 463-469
- Tsuji T, Watanabe Y, Katoh H, Sato K, Kunieda T (1998) Cloning and mapping of the moose Gpx2 gene encoding gastrointestinal glutathione peroxidase. *J. Vet. Med. Sci.* 60(5): 651-654
- Tuan DYH, Solomon WB, London IM, Lee DP (1989) An erythroid-specific, developmental-stage-independent enhancer far upstream of the human "β-like globin" genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2554-2558

- Vanin EF **(1985)** Processed pseudogenes - characteristics and evolution. *Ann. Rev. Genet.* 19: 253-272
- Varmus H, Weinberg RA **(1994)** Gene und Krebs: biologische Wurzeln der Krebsentstehung. Heidelberg; Berlin; Oxford, Spektrum Akad. Verl., 1994
- Wagner M **(1986)** A consideration of the origin of processed pseudogenes *Trends Gent.* 5: 134-137
- Walsh BJ, Gooley AA, Williams KL, Breit SN **(1995)** Identification of macrophage activation association proteins by two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *J. Leukocyte Biol.* 57: 507-512
- Wasylyk B, Hahn SL, Giovane A **(1993)** The Ets family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 211: 7-18
- Weber-Norst RM, Mertelsmann R, Finke J **(1998)** The JAK-STAT pathway: signal transduction involved in proliferation, differentiation and transformation. *Leuk. Lymphoma* 28(5-6): 459-467
- Weiner AM, Deininger PL, Efstratiadis A **(1986)** Nonviral retroposons, genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 631-661
- Whisler RL, Newhouse YG, Bei Qing L, Karanfilov BK, Goyette MA, Hackshaw KV **(1994)** Regulation of protein kinase activity in Jurkat T cells during oxidative stress uncoupled from tyrosine kinases: role of oxidative changes in protein kinase activation requirements and generation of second messengers. *Lymphokine-Cytokine-Res.* 13(6): 399-410
- Winge DR **(1998)** Copper-regulatory domain involved in gene expression. *Prog. Nucl Acid Res. Mol. Biol.* 58: 165-195
- Yang C, Shapiro LH, Rivera M, Kumar A, Brindle PK **(1998)** A role for CREB binding protein and p300 transcriptional coactivators in Ets-1 transactivation functions. *Mol. Cell Biol.* 18(4): 2218-2229
- Yenofsky R, Cereghini S, Krowczynska A, Brawerman G **(1983)** Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell Biol.* 3: 1197-1203
- Yu ZW, Quinn PJ **(1994)** Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. *Biosci. Rep.* 14(6): 259-281

## Danksagung

Sehr herzlich danken möchte ich Prof. Dr. Hartmut Kühn für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Vater. Er war ständig um meine wissenschaftliche Ausbildung bemüht und stand mir jederzeit in Rat und Tat als Ansprechpartner bei der Planung von Experimenten und dem kritischen Lesen dieser Arbeit zur Seite.

Für die Wegbereitung meines Aufenthaltes am St. George's Hospital in London möchte an dieser Stelle sehr herzlich Dr. Ulrich-Axel Bommer danken. Er bemühte sich in dieser Zeit sehr um meine wissenschaftliche Fortbildung und bot stets Anlaß zu Diskussionen über die Funktion des translationell kontrollierten Tumorproteins.

Dr. Peter Nürnberg und Dr. Carola Marczinek möchte ich für die Zusammenarbeit bei der Suche nach dem humanen *TPT1*-Gen und der freundlichen Überlassung der Rekombinanten danken.

Mario Berger danke ich für die gemeinsame Erarbeitung von Erkenntnissen über das translationell kontrollierte Tumorprotein und zahlreichen hilfreichen Diskussionen sowie der Bereitstellung von Bildmaterial.

Claudia Lenzner und Andreas Castrischer möchte ich für ihre Unterstützung bei den Transfektionsexperimenten danken. Mein Dank gilt auch Dr. Peter Ludwig, Dr. Dagmar Heydeck, Dr. Kerstin Schnurr und Kristin Schwarz die mich beim Umgang mit Zellkulturen unterstützten.

Für die freundliche und kompetente Beratung und zahlreich Tips im Labor möchte ich ferner Dr. Antje Huth und Iris Reimann danken.

Allen anderen Mitarbeitern und technischen Assistenten des Institutes für Biochemie der Humboldt-Universität zu Berlin, besonders, Brigitte Nack, Alexander Kloß, Christa Gerth und Elke Bürger danke ich für ihre freundliche Unterstützung und Anteilnahme an meiner Arbeit.

*gewidmet meinen Eltern, Danke.*

## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die vorliegende Arbeit von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 6. April 2000



# Lebenslauf



## Persönliche Angaben

Name: Holger Thiele  
 Geburtsdatum: 18. Dezember 1970  
 Geburtsort: Hennigsdorf  
 e-mail: holger.thiele@rz.hu-berlin.de

## Ausbildung

1977 - 1987 Besuch der 22. zehnklassigen allgemeinbildenden polytechnischen Oberschule "Arthur Ogrowsky" in Berlin  
 1988 - 1989 Besuch der erweiterten allgemeinbildenden polytechnischen Oberschule "Friedrich Engels" in Berlin.  
 Okt 1989 - Aug 1990 Pflegepraktikum an der Charité der Humboldt-Universität zu Berlin (HU-Berlin)  
 Sept 1990 - Juli 1991 Zivildienst im Institut für Immunologie an der HU-Berlin  
 Aug 1991 - Dez 1991 Tätigkeit als Laborgehilfe im Institut für Biochemie an der HU-Berlin  
 Okt 1992 - Aug 1999 Studium der Humanmedizin an der HU- Berlin

## Famulaturen

Sept 1995 Klinik für innere Medizin im Krankenhaus Kaulsdorf in Berlin  
 März 1996 Onkologische Station des St. George's Hospital in London  
 Sept 1996 Kardiologische Station im Krankenhaus Kaulsdorf in Berlin  
 März 1997 Chirurgisch ambulante Gemeinschaftspraxis Dr. Zielke und Dr. Sternkopf in Berlin

## Praktisches Jahr

Apr. 1998 - Juli 1998 Rheumaklinik Berlin-Buch  
 Aug. 1998 - Nov. 1998 Neurologische und epileptologische Station des Königin Elisabeth Krankenhauses Herzberge in Berlin  
 Dez. 1998 - März 1999 Chirurgische Station des Königin Elisabeth Krankenhauses Herzberge in Berlin

Berlin, den 6. April 2000

*Holger Thiele*

## Publikationsliste

- Thiele H**, Berger M, Lenzner C, Kühn H, Thiele BJ (1998) Structure of the promoter and complete sequence of the gene coding for the rabbit translationally controlled tumor protein (TCTP) P23. *Eur. J. Biochem.* 257: 62-68
- Thiele H**, Berger M, Thiele BJ (1999) Expression of alternative cDNAs and processed pseudogenes coding for the human and rabbit translationally controlled tumor protein (TCTP). *Eur. J. Biochem.* **submitted**
- Thiele BJ, Berger M, Huth A, Reimann I, **Thiele H**, Ostareck-Lederer A, Ostareck D, Hentze M (1999) Tissue-specific expression of 15-LOX mRNA. *Prostaglandiens.* 55(Suppl.1): 77
- Berger M, Schwarz K, **Thiele H**, Reimann I, Huth A, Borngräber S, Kühn H, Thiele BJ (1998) Simultaneous expression of leukocyte-type 12-lipoxygenase and reticulocyte-type 15-lipoxygenase in rabbits. *J. Mol. Biol.* 278: 935-948
- Thiele BJ, Berger M, Huth A, Schwarz K, Reimann I, **Thiele H** (1999) Tissue-specific expression of 12- and 15-lipoxygenase mRNAs differing in their 3'-untranslated region. *Nucl. Acids Res.* 27(8): 1828-1836
- Thiele BJ, Berger M, Schwarz K, Borngräber S, Kühn H, Ostareck-Lederer A, **Thiele H** (1999) Expression of leukocyte-type 12-lipoxygenase and reticulocyte-type 15-lipoxygenase in rabbits. *Adv. Exp. Med. Biol.* 447: 45-61
- Thiele BJ, Berger M, **Thiele H**, Reimann I, Huth A Features of mammalian lipoxygenases. 1997 *La Jolla Conference on eicosanoids and other bioactive lipids in cancer, inflammation and related diseases*. K.V. Honn, ed., 1998, published lecture, 1999, in press